

**Evaluación del pretratamiento oxidativo con peróxido de hidrógeno sobre cascarilla de café y bagazo de caña de azúcar a escala de laboratorio, para la producción de bioetanol de segunda generación**

**Daniel Yesid Ardila Núñez**

**Trabajo de grado para optar por el título de Químico Ambiental**

**Directora del proyecto**

**Olga Lucia Bayona MSc. Qca.**

**Codirectora del proyecto**

**Angélica María Candela Soto MSc. Qca. PhD**

**Universidad Santo Tomás, Bucaramanga**

**División de Ingenierías y Arquitectura**

**Facultad de Química Ambiental**

**2021**

### **Dedicatoria**

A mi abuela Esperanza que siempre me apoyó a lo largo de mi carrera y a mi abuela Isabel que ya no se encuentra a mi lado.

### **Agradecimientos**

A mis padres, mis abuelas y mi novia por su apoyo incondicional.

A mis directoras de tesis Olga y Angélica, por haberme dado la confianza y la oportunidad de trabajar con ellas para desarrollar mi tesis de grado.

## Contenido

|                                                                                                                                                                                                              | Pág. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Introducción .....                                                                                                                                                                                           | 14   |
| 1. Evaluación del Pretratamiento Oxidativo con Peróxido de Hidrógeno Sobre Cascarilla de Café y Bagazo de Caña de Azúcar a Escala de Laboratorio para la Producción de Bioetanol de Segunda Generación ..... | 18   |
| 1.1. Planteamiento del Problema.....                                                                                                                                                                         | 18   |
| 1.2. Justificación.....                                                                                                                                                                                      | 19   |
| 1.3. Objetivos .....                                                                                                                                                                                         | 21   |
| 1.3.1. Objetivo General.....                                                                                                                                                                                 | 21   |
| 1.3.2. Objetivos Específicos .....                                                                                                                                                                           | 21   |
| 2. Marco Referencial.....                                                                                                                                                                                    | 22   |
| 2.1. Marco Teórico .....                                                                                                                                                                                     | 22   |
| 2.1.1. Biomasa .....                                                                                                                                                                                         | 22   |
| 2.1.2. Material lignocelulósico .....                                                                                                                                                                        | 23   |
| 2.1.3. Cascarilla de café.....                                                                                                                                                                               | 26   |
| 2.1.4. Bagazo de caña de azúcar .....                                                                                                                                                                        | 28   |
| 2.1.5. Bioetanol.....                                                                                                                                                                                        | 29   |
| 2.1.6. Pretratamientos .....                                                                                                                                                                                 | 30   |
| 2.1.7. Hidrólisis enzimática .....                                                                                                                                                                           | 33   |
| 2.1.8. Reactores químicos.....                                                                                                                                                                               | 33   |
| 2.1.9. Técnicas instrumentales.....                                                                                                                                                                          | 34   |

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.10. Laboratorio Nacional de Energía Renovable (National Renewable Energy Laboratory, NREL) .....                   | 36 |
| 2.2. Marco de Antecedentes .....                                                                                       | 37 |
| 3. Método .....                                                                                                        | 39 |
| 3.1. Determinación de humedad.....                                                                                     | 41 |
| 3.2. Determinación de cenizas.....                                                                                     | 41 |
| 3.3. Determinación de lignina .....                                                                                    | 42 |
| 3.3.1. Determinación de lignina insoluble en ácido (LIA) .....                                                         | 42 |
| 3.3.2. Determinación de lignina soluble en ácido (LSA) .....                                                           | 43 |
| 3.4. Determinación de carbohidratos estructurales .....                                                                | 44 |
| 3.5. Caracterización por técnicas instrumentales .....                                                                 | 45 |
| 3.5.1. Caracterización por Difracción de Rayos X (DRX).....                                                            | 45 |
| 3.5.2. Caracterización por microscopia electrónica de barrido .....                                                    | 45 |
| 3.5.3. Caracterización por Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR). 45                            |    |
| 3.6. Diseño de experimentos 2 <sup>3</sup> para evaluar el desempeño del pretratamiento con peróxido de hidrógeno..... | 46 |
| 3.7. Hidrólisis enzimática.....                                                                                        | 48 |
| 3.8. Desarrollo de un prototipo de reactor químico para pretratamientos de biomاسas .....                              | 49 |
| 4. Resultados y discusión.....                                                                                         | 49 |
| 4.1. Determinación de la composición del bagazo de caña de azúcar y la cascarilla de café ...                          | 49 |
| 4.1.1. Determinación del porcentaje de humedad .....                                                                   | 49 |
| 4.1.2. Determinación del porcentaje de cenizas .....                                                                   | 50 |
| 4.1.3. Determinación del porcentaje de lignina .....                                                                   | 51 |

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.4. Determinación de celulosa y hemicelulosa .....                                                                  | 52 |
| 4.2. Evaluación de la etapa de pretratamiento con peróxido de hidrógeno mediante un diseño de experimentos $2^3$ ..... | 56 |
| 4.2.1. Diseño de experimentos $2^3$ sobre el bagazo de caña de azúcar .....                                            | 57 |
| 4.2.2. Diseño de experimentos $2^3$ sobre la cascarilla de café .....                                                  | 58 |
| 4.3. Hidrólisis enzimática.....                                                                                        | 60 |
| 4.4. Caracterización por técnicas instrumentales .....                                                                 | 62 |
| 4.4.1. Caracterización por difracción de rayos X (DRX) .....                                                           | 62 |
| 4.4.2. Caracterización por espectroscopia infrarroja (IR) .....                                                        | 67 |
| 4.4.3. Caracterización por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) .....                                              | 69 |
| 4.5. Desarrollo de un prototipo de reactor.....                                                                        | 72 |
| 4.5.1. Determinación de las características principales de un reactor para pretratamientos químicos .....              | 72 |
| 5. Conclusiones .....                                                                                                  | 79 |
| Referencias.....                                                                                                       | 82 |

## Lista de Tablas

|                                                                                                                                                                                 | Pág. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Tabla 1.</b> <i>Composición estructural de residuos agrícolas.</i> .....                                                                                                     | 24   |
| <b>Tabla 2.</b> <i>Composición de la cascarilla de café</i> .....                                                                                                               | 27   |
| <b>Tabla 3.</b> <i>Composición del bagazo de caña de azúcar.</i> .....                                                                                                          | 29   |
| <b>Tabla 4.</b> <i>Tipos de pretratamientos sobre biomasa lignocelulósica.</i> .....                                                                                            | 31   |
| <b>Tabla 5.</b> <i>Protocolos NREL.</i> .....                                                                                                                                   | 40   |
| <b>Tabla 6.</b> <i>Rango de valores estudiados en el diseño experimental factorial completo del pretratamiento con peróxido de hidrógeno 2<sup>3</sup>.</i> .....               | 46   |
| <b>Tabla 7.</b> <i>Condiciones de los ensayos del pretratamiento.</i> .....                                                                                                     | 46   |
| <b>Tabla 8.</b> <i>Condiciones de hidrólisis enzimática.</i> .....                                                                                                              | 48   |
| <b>Tabla 9.</b> <i>Porcentaje de humedad de la cascarilla de café y bagazo de caña</i> .....                                                                                    | 50   |
| <b>Tabla 10.</b> <i>Porcentaje de cenizas de la cascarilla de café y bagazo de caña</i> .....                                                                                   | 50   |
| <b>Tabla 11.</b> <i>Porcentajes de lignina soluble, insoluble y total del bagazo de caña de azúcar y la cascarilla de café</i> .....                                            | 51   |
| <b>Tabla 12.</b> <i>Resultados de porcentajes de azúcares.</i> .....                                                                                                            | 54   |
| <b>Tabla 13.</b> <i>Valores de celulosa y hemicelulosa para el bagazo de caña de azúcar</i> .....                                                                               | 55   |
| <b>Tabla 14.</b> <i>Valores de celulosa y hemicelulosa para la cascarilla de café</i> .....                                                                                     | 55   |
| <b>Tabla 15.</b> <i>Diseño de experimentos 2<sup>3</sup> con peróxido de hidrógeno sobre el bagazo de caña de azúcar</i> .....                                                  | 57   |
| <b>Tabla 16.</b> <i>Diseño de experimentos 2<sup>3</sup> con peróxido de hidrógeno sobre la cascarilla de café...</i>                                                           | 59   |
| <b>Tabla 17.</b> <i>Rendimientos de la hidrólisis enzimática sobre el bagazo de caña de azúcar y la cascarilla de café junto con la concentración de glucosa obtenida</i> ..... | 60   |

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 18.</b> <i>Condiciones operacionales de la etapa de pretratamiento</i> .....                     | 73 |
| <b>Tabla 19.</b> <i>Descripción del reactor</i> .....                                                     | 75 |
| <b>Tabla 20.</b> <i>Resumen de las características del reactor</i> .....                                  | 77 |
| <b>Tabla 21.</b> <i>Especificaciones del reactor de vidrio enchaquetado para pretratamiento químico..</i> | 78 |

## Lista de Figuras

|                                                                                                                                 | Pág. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Figura 1.</b> <i>Clasificación de residuos agrícolas.</i> .....                                                              | 22   |
| <b>Figura 2.</b> <i>Composición de la biomasa lignocelulósica.</i> .....                                                        | 23   |
| <b>Figura 3.</b> <i>Estructura de la celulosa.</i> .....                                                                        | 24   |
| <b>Figura 4.</b> <i>Estructura de los principales componentes de la hemicelulosa.</i> .....                                     | 25   |
| <b>Figura 5.</b> <i>Estructura de los principales compuestos de la lignina.</i> .....                                           | 26   |
| <b>Figura 6.</b> <i>Estructura del grano de café.</i> .....                                                                     | 27   |
| <b>Figura 7.</b> <i>Bagazo de caña de azúcar</i> .....                                                                          | 28   |
| <b>Figura 8.</b> <i>Proceso general de obtención de bioetanol 2G.</i> .....                                                     | 30   |
| <b>Figura 9.</b> <i>Conversión de celulosa a glucosa.</i> .....                                                                 | 33   |
| <b>Figura 10.</b> <i>Diseño metodológico</i> .....                                                                              | 40   |
| <b>Figura 11.</b> <i>Curva de calibrado para la determinación de arabinosa</i> .....                                            | 53   |
| <b>Figura 12.</b> <i>Curva de calibrado para la determinación de xilosa</i> .....                                               | 53   |
| <b>Figura 13.</b> <i>Curva de calibrado para la determinación de glucosa</i> .....                                              | 53   |
| <b>Figura 14.</b> <i>Curva de calibrado para la determinación de celobiosa</i> .....                                            | 54   |
| <b>Figura 15.</b> <i>Difractogramas del bagazo de caña de azúcar pretratado e hidrolizado, ensayo 3 (a), ensayo 4 (b)</i> ..... | 63   |
| <b>Figura 16.</b> <i>Difractograma de la cascarilla de café pretratado e hidrolizado, ensayo 3 (a), ensayo 4 (b)</i> .....      | 65   |
| <b>Figura 17.</b> <i>Espectros IR del bagazo de caña en estado natural, ensayo 3 y 4</i> .....                                  | 67   |
| <b>Figura 18.</b> <i>Espectros IR de la cascarilla de café en estado natural, ensayos 3 y 4</i> .....                           | 68   |
| <b>Figura 19.</b> <i>Micrografía de la cascarilla de café en estado natural</i> .....                                           | 69   |

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 20.</b> <i>Micrografía de la cascarilla de café posterior al pretratamiento con peróxido de hidrógeno (ensayo 3)</i> ..... | 70 |
| <b>Figura 21.</b> <i>Micrografía de la cascarilla de café posterior al pretratamiento con peróxido de hidrógeno (ensayo 4)</i> ..... | 71 |
| <b>Figura 22.</b> <i>Micrografía de la cascarilla de café posterior a la hidrólisis enzimática (ensayo 3)</i>                        | 71 |
| <b>Figura 23.</b> <i>Reactor en vidrio enchaquetado para pretratamientos químicos</i> .....                                          | 74 |
| <b>Figura 24.</b> <i>Diseño del impulsor y aleta graduable</i> .....                                                                 | 76 |
| <b>Figura 25.</b> <i>Reactor de vidrio enchaquetado para pretratamiento químico</i> .....                                            | 77 |
| <b>Figura 26.</b> <i>Ensamble general del reactor</i> .....                                                                          | 78 |

## Resumen

El bioetanol de segunda generación constituye una alternativa importante para la demanda energética a en el ámbito mundial además de disminuir las emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera y reducir el impacto ambiental generado por el uso de combustibles fósiles. Sin embargo, se requieren de pretratamientos sobre el material lignocelulósico para mejorar los rendimientos de obtención del biocombustible. Por lo tanto, en esta investigación se evaluó el pretratamiento oxidativo con peróxido de hidrógeno sobre el bagazo de caña de azúcar y la cascarilla de café, mediante el uso de un diseño de experimentos 2<sup>3</sup> con triplicado en el punto central, teniendo como variables la concentración de reactivo, el tiempo de pretratamiento y la temperatura. Las biomásas fueron caracterizadas antes y después del pretratamiento empleando microscopia electrónica de barrido (MEB), espectroscopia infrarroja (IR) y difracción de rayos x (DRX), además de las caracterizaciones estructurales de la biomasa. Los resultados del análisis estadístico indicaron que, en el diseño experimental sobre el bagazo de caña, las variables que presentaron mayor significancia fueron la temperatura y concentración de peróxido. Por su parte, para el diseño experimental sobre la cascarilla de café, la temperatura fue la única variable de relevancia. Los análisis de IR y MEB, indicaron la remoción de lignina por el pretratamiento oxidativo y el análisis de DRX mostró la reducción del índice de cristalinidad del material pretratado.

*Palabras Clave:* Bioetanol de segunda generación, biomasa lignocelulósica, pretratamientos oxidativos, diseño de experimentos, bagazo de caña de azúcar, cascarilla de café.

### **Abstract**

Second-generation bioethanol constitutes an important alternative for energy demand worldwide, in addition to reducing CO<sub>2</sub> emissions into the atmosphere and reducing the environmental impact generated by the use of fossil fuels. However, pretreatments are required on the lignocellulosic material to improve the yields of obtaining the biofuel. Therefore, in this research, the oxidative pretreatment with hydrogen peroxide was evaluated on the sugarcane bagasse and the coffee husk, by using a design of experiments 2<sup>3</sup> with triplicate in the central point, having as variables the concentration reagent, pretreatment time and temperature. The biomasses were characterized before and after pretreatment using scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy (IR) and x-ray diffraction (XRD), in addition to structural characterizations of the biomass. The results of the statistical analysis indicated that, in the experimental design on sugarcane bagasse, the variables that presented greater significance were temperature and peroxide concentration. For its part, for the experimental design on the coffee husk, temperature was the only relevant variable. The IR and SEM analyzes indicated the removal of lignin by the oxidative pretreatment and the XRD analysis showed the reduction of the crystallinity index of the pretreated material.

*Keywords:* Second generation bioethanol, lignocellulosic biomass, oxidative pretreatments, design of experiments, sugarcane bagasse, coffee husk.

### **Glosario**

*Biomasa recalcitrante:* la recalcitrancia es la capacidad que tiene la biomasa lignocelulósica de resistir la hidrólisis enzimática, y es causada por las fuertes interacciones y complejas estructuras de sus componentes (Choi, y otros, 2019).

*Biorrefinería:* es definida como el uso optimizado de la biomasa para materiales, productos químicos, combustibles y aplicaciones energéticas, donde el uso se relaciona con los costos, el rendimiento, el medio ambiente, el equilibrio de carbono y los aspectos sociales (Rosendahl, 2013).

*Energías alternativas:* fuentes de energía utilizadas para suplementar las energías convencionales o tradicionales. Se destacan por su capacidad de recuperación natural y cantidad en relación a los consumos de los seres humanos pueden hacer de ellas, además son fuentes renovables (Estrada, 2012).

*Fermentación alcohólica:* proceso de biotransformación en el que se llevan a cabo cambios químicos en un sustrato orgánico por la acción de enzimas sintetizadas por microorganismos conocidos como biocatalizadores, donde su función principal es convertir hexosas en etanol (Aimaretti, Ybalo, Escorcia, & Codevilla, 2012).

## Introducción

La creciente demanda energética y la necesidad de mejorar la seguridad del suministro a toda la población, son grandes problemáticas que afrontan los gobiernos actuales, ya que se estima que para el año 2040, la demanda de energía se incrementará significativamente en aproximadamente un 28% de su consumo actual (Mankar, Pandey, Modak, & Pant, 2021). A esto se le suman que las fuentes tradicionales de energía, como las reservas de combustibles fósiles (carbón, petróleo crudo, etc.) son recursos finitos no renovables y que además generan grandes impactos ambientales por su uso indiscriminado a nivel mundial (Meenaskshisundaram, Fayeulle, Leonard, Ceballos, & Paus, 2021). Por ello, es necesario investigar fuentes de energía renovable, que permitan disminuir la dependencia humana sobre los combustibles fósiles, suplan la demanda energética y reduzcan los impactos adversos al medio ambiente (Usmani, y otros, 2021).

Para combatir el cambio climático y contrarrestar la futura escasez de combustibles fósiles, muchos países en todo el mundo han establecido sus hojas de ruta para lograr el desarrollo sostenible a través de la bioeconomía. Ejemplos como el lanzamiento de la estrategia de bioeconomía de la comisión europea en 2012, la inclusión de la bioeconomía como un motor de crecimiento clave en las prioridades de investigación y desarrollo del año fiscal 2021 de Estados Unidos y las políticas de desarrollo sostenible en Colombia, son indicadores del enfoque y desplazamiento que están teniendo los países hacia el sector bioenergético. A esto se suma el aumento en la demanda mundial de bioetanol, que en los últimos años se ha disparado por las políticas energéticas de Brasil, China, Estados Unidos y la Unión Europea que promueven el rápido crecimiento del biocombustible (Usmani, y otros, 2021).

Existen tres tipos de bioetanol, que dependen del tipo de biomasa empleada para su obtención. El bioetanol de primera generación (1G) proviene de plantas y vegetales alimenticios.

El bioetanol de segunda generación (2G), que proviene de desechos agroindustriales y no compite con la producción de alimentos y el bioetanol de tercera generación (3G) el cual es obtenido a partir de plantas y vegetales no alimenticios y de rápido crecimiento como lo son pastos, algas y algunas cortezas de árboles. Sin embargo, el cambio hacia la energía renovable debe realizarse sin desviar el uso de la tierra o los cultivos alimentarios para la producción de energía. Por ello, para disminuir la competencia que pueda existir por las tierras de cultivo entre los recursos renovables y la agricultura para alimentos, se busca establecer procesos de producción de bioetanol de segunda generación (2G) para complementar o remplazar los procesos de bioetanol de primera generación (1G) ya estandarizados.

En la producción de bioetanol de segunda generación (2G) se buscan fuentes no convencionales (de bajo costo), subproductos y materias primas no usadas para alimentación humana o animal, con alto contenido de almidón o azúcares fermentables (Hoyos, Bello, Yee, Rodriguez, & Aguirre, 2017), como son los residuos agroindustriales (bagazo de caña de azúcar, hojas de caña de azúcar y maíz, residuos y colecta de café, cacao y palma africana, entre otros). Estos residuos agroindustriales son también conocidos como biomasa lignocelulósica debido a que la estructura de estos compuestos es de polímeros celulósicos y hemicelulósicos (Suarez, Candela, Henao, & Bayona, 2019).

Colombia actualmente genera gran cantidad de residuos lignocelulósicos por sus actividades agroindustriales, ya que destina una alta cantidad de hectáreas para uso agrícola (DANE, 2020). Para el 2019, Colombia tuvo un total de 4'329.016 hectáreas de cultivo sembradas, de las cuales 584.122 hectáreas fueron siembras de café (Portafolio, 2020), con una producción de 14,8 millones de sacos de 60kg (Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, 2019), y la caña de azúcar con 241.205 hectáreas sembradas de las cuales se produjeron 24,3 millones de toneladas

(Asocaña, 2019). La extracción de estos cultivos genera gran cantidad de residuos lignocelulósicos, como la cascarilla de café que representa el 4,2% del peso del fruto de café (Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, s.f.), y el bagazo de caña de azúcar donde se producen anualmente alrededor de 6 millones de toneladas (Asocaña, 2019), esta biomasa residual contiene altos contenidos de azúcares fermentables que no son aprovechados (Kim, Choi, Lee, Kim, & Bae, 2017), volviendo la cascarilla de café y el bagazo de caña de azúcar materiales prometedores para la producción de bioetanol de segunda generación (2G).

Sin embargo, la producción de bioetanol 2G a escala industrial aún tiene algunos desafíos para los investigadores debido a que las biomاسas lignocelulósicas requieren de hidrólisis y fermentaciones enzimáticas (Mohapatra, Dandapat, & Thatoi, 2017), y según la biomasa que se esté manejando, esta puede resultar altamente recalcitrante y resistente a la hidrólisis (Nguyen, Cho, Trinh, Jeong, & Bae, 2017), debido a que el material lignocelulósico presenta extensos enlaces de hidrógeno entre las moléculas de celulosa generando microfiltros con regiones cristalinas y altamente ordenadas que se entrelazan aún más con los polímeros de hemicelulosa y lignina formando una estructura compleja y robusta (Alayoubi, y otros, 2020).

Es por esto por lo que se han implementado pretratamientos a las biomاسas, ya que aumentan los rendimientos de obtención de bioetanol, debido a que rompen la estructura compacta de la lignina y la hemicelulosa, generando mayor superficie de contacto entre la enzima y la celulosa durante la etapa de la hidrólisis enzimática, con lo cual aumenta la disponibilidad de los azúcares fermentables. Además, la implementación del tratamiento previo también permite disminuir la cantidad de lignina presente en la biomasa y también reduce el índice de cristalinidad de la celulosa, los cuales son los principales factores que reducen los rendimientos en la etapa de la hidrólisis enzimática.

En esta investigación se evaluó el desempeño del pretratamiento de la cascarilla de café y el bagazo de caña de azúcar con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), a través del uso de un diseño de experimentos  $2^3$  con triplicado en el punto central. La caracterización de la biomasa lignocelulósica se llevó a cabo antes y después del tratamiento mediante SEM, FTIR y DRX, además de las caracterizaciones estructurales de la biomasa.

## **1. Evaluación del Pretratamiento Oxidativo con Peróxido de Hidrógeno Sobre Cascarilla de Café y Bagazo de Caña de Azúcar a Escala de Laboratorio para la Producción de Bioetanol de Segunda Generación**

### **1.1. Planteamiento del Problema**

Preocupaciones ambientales y la futura limitación de las reservas de combustibles fósiles tienen centrada la atención del mundo actual. La disminución en la disponibilidad de petróleo acarreará el aumento en los precios, crisis en el mercado energético, además de la alteración climática ocasionada por la quema de este tipo de combustible. El mundo afronta el hecho de que la población aumenta vertiginosamente y a su vez aumenta la industrialización, y el consumo de recursos no renovables como el petróleo y sus derivados (Plaza, Daza, Coral, García, & Villafuerte, 2015).

Debido a toda esta problemática que gira alrededor del uso de los combustibles fósiles se han propuesto alternativas más limpias como es el uso de los biocombustibles para suplir la demanda energética. Es por esto por lo que el bioetanol obtenido a partir de la biomasa se ha considerado como una alternativa al combustible tradicional, debido a sus propiedades inherentes que son una ventaja frente a los combustibles generados a través del petróleo (Moncada & Castro, 2016).

La biomasa generada por los organismos fotosintéticos, que almacenan la energía en forma de azúcares, se puede transformar en etanol mediante procesos de fermentación (Hoyos, Bello, Yee, Rodriguez, & Aguirre, 2017). Brasil y Estados Unidos son los dos principales países que han implementado exitosamente el bioetanol como fuente de energía alternativa, ya que el etanol producido a partir del jugo de caña (Brasil) y el almidón (Estados Unidos), son un producto

energético establecido y han demostrado signos de que el etanol sea completamente competitivo con la gasolina y sea adecuado para la replicación en otros países. Aproximadamente >37,85 billones de litros de etanol se producen a nivel mundial por año, empleando maíz, caña de azúcar y remolacha azucarera a través de procesos de primera generación (1G) completamente maduros y bien establecidos (Da Silva & Chandel, 2014). Sin embargo, la implementación de los procesos de producción de bioetanol aún trae ciertos retos para las biorrefinerías, ya que actualmente los principales procesos de producción de bioetanol son los de primera generación (1G), los cuales pueden generar competencia con el sector alimenticio por la distribución de los cultivos. Una solución es la implementación de procesos de bioetanol de segunda generación (2G) que emplean residuos agroindustriales lignocelulósicos, pero su desventaja radica en la implementación de una etapa de pretratamiento para deslignificar las biomásas y así aumentar los rendimientos de obtención de bioetanol (Firouzi, Sadegh, Isazadeh, Nikkhah, & Van Haute, 2021), ya que se hace necesario el desarrollo de investigaciones sobre los diversos tipos de pretratamientos y su eficacia en la mejora de los rendimientos de obtención del biocombustible.

Teniendo en cuenta todos los puntos mencionados, el impulso está cambiando hacia la implementación de combustibles derivados de la biomasa por su alto potencial de remplazar la economía global del combustible fósil por una economía de combustible renovable, sin embargo, se requiere del desarrollo y estudio de los diferentes tipos de pretratamientos sobre los diversos residuos lignocelulósicos producidos por la agroindustria.

## **1.2. Justificación**

Para desligar el crecimiento económico del uso de los combustibles fósiles, así como también disminuir la contaminación ambiental debido a su combustión, se ha aumentado el interés

en el aprovechamiento de los recursos naturales renovables para la obtención de energía, lo que se conoce como energías alternativas (Plaza, Daza, Coral, García, & Villafuerte, 2015), o bioenergía, las cuales se pueden clasificar principalmente como solar, eólica, hidrotérmica y derivada de la biomasa (Hoyos, Bello, Yee, Rodriguez, & Aguirre, 2017). Entre las fuentes de energía renovable (que constituyen alrededor del 23,7% de la demanda energética total) (Mankar, Pandey, Modak, & Pant, 2021), los combustibles derivados de la biomasa, en particular el bioetanol, están ganando gran importancia debido a sus propiedades inherentes (Da Silva & Chandel, 2014).

Se requieren tres pasos básicos para convertir la biomasa lignocelulósica en productos químicos de valor añadido: pretratamiento, hidrólisis y fermentación. La conversión exitosa de biomasa lignocelulósica necesita un pretratamiento efectivo como un paso importante para optimizar el proceso. En la naturaleza, los materiales lignocelulósicos son recalcitrantes debido a la estructura cristalina de la celulosa y al contenido de lignina. La biomasa lignocelulósica se compone de lignina, hemicelulosa y celulosa. El factor fuerte que afecta en gran medida la hidrólisis es la longitud de la cadena de carbohidratos como la celulosa. Después del pretratamiento, los azúcares poliméricos de la hemicelulosa y la celulosa serán más hidrolizables en monómeros libres como glucosa y xilosa (Akhlisah, Yunus, Abidin, Lim, & Kania, 2021).

Los pretratamientos se clasifican en físicos, químicos, biológicos y combinados entre sí, los pretratamientos químicos oxidativos con peróxido de hidrógeno resultan ser una gran alternativa, debido a los buenos rendimientos obtenidos en la deslignificación de la biomasa y la disminución en el índice de cristalinidad de la celulosa, lo que aumenta su sección amorfa y con ello aumenta la conversión de azúcares en la hidrólisis enzimática.

En esta investigación se evaluó la influencia del pretratamiento oxidativo con peróxido de hidrógeno sobre los residuos agroindustriales bagazo de caña de azúcar y cascarilla de café para

la posterior producción de bioetanol de segunda generación. Por otro lado, se sabe que la caña de azúcar es usada para la producción de bioetanol, para el 2019 Colombia tuvo una producción de 444 millones de litros a partir de esta biomasa (Sector agroindustrial de la caña, 2019). Sin embargo, hay pocas investigaciones acerca del uso de la cascarilla de café para la producción de bioetanol

### **1.3.Objetivos**

#### ***1.3.1. Objetivo General***

Evaluar el desempeño del pretratamiento oxidativo con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) sobre la cascarilla de café y el bagazo de caña de azúcar a escala de laboratorio, para la producción de bioetanol de segunda generación, a través del uso de un diseño de experimentos  $2^3$  con triplicado en el punto central.

#### ***1.3.2. Objetivos Específicos***

Caracterizar el bagazo de caña de azúcar y la cascarilla de café antes y después de la etapa del pretratamiento oxidativo con peróxido de hidrógeno.

Evaluar la influencia de las variables de concentración de peróxido, tiempo de pretratamiento y temperatura, durante la etapa del pretratamiento en la remoción de lignina y afectación de la celulosa y hemicelulosa.

Diseñar un prototipo de reactor de pretratamiento a escala de laboratorio, que profundice en el sistema de agitación.

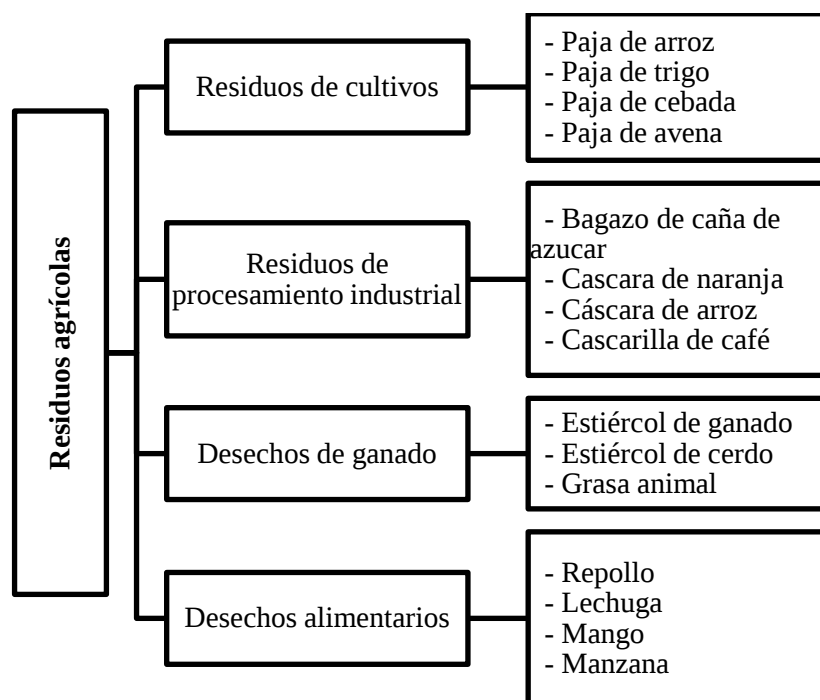
## 2. Marco Referencial

### 2.1. Marco Teórico

#### 2.1.1. Biomasa

El termino biomasa hace referencia a toda materia orgánica proveniente de árboles, plantas y desechos de animales que puedan ser convertidos en energía (Cortes, 2011). La mayoría de ésta es producida por las plantas mediante la fotosíntesis, proceso en el que convierten la energía solar en material vegetal (Montaño, 2014). En la Figura 1 se muestra la clasificación y algunos ejemplos de residuos del sector agrícola.

**Figura 1.** Clasificación de residuos agrícolas.

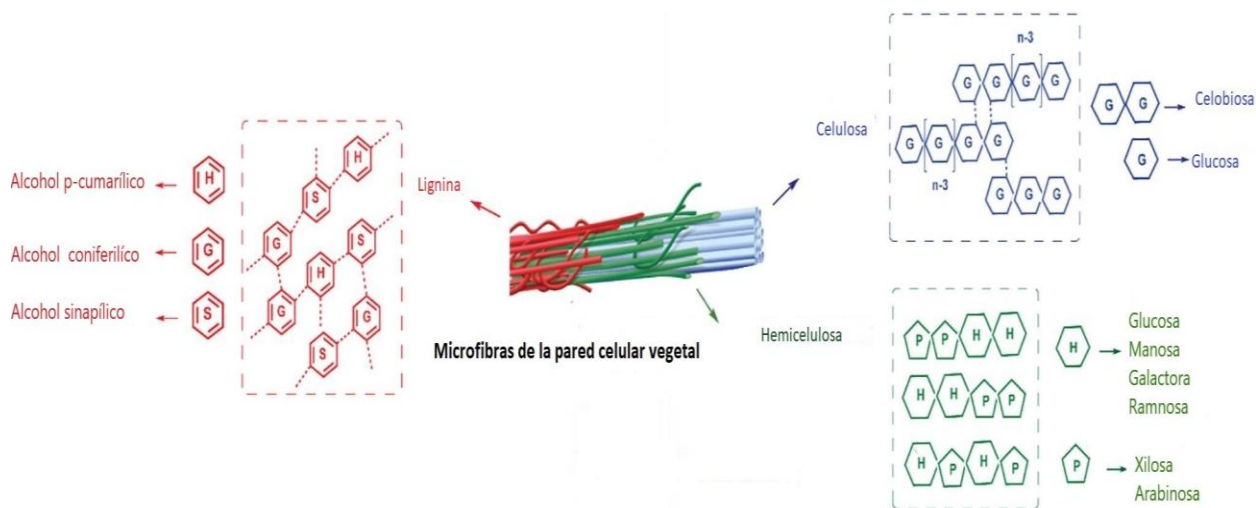


Adaptado de “Second and Third Generation of Feedstocks”, por (Basile & Dalena, 2019, págs. 104-105).

### 2.1.2. Material lignocelulósico

El material lignocelulósico está constituido por celulosa (20-60%), hemicelulosa (20-30%) y lignina (15-40%), los cuales son biopolímeros estructurales, siendo la celulosa y hemicelulosa polisacáridos que pueden ser hidrolizados en azúcares simples por enzimas para, posteriormente, ser fermentados en bioetanol por microorganismos (Alayoubi, y otros, 2020). Este material presenta un entramado de microfibras de celulosa las cuales forman capas recubiertas de hemicelulosa y sobre las que se deposita la lignina generando una estructura compacta (Barroso, 2010). En la Figura 2 se muestra la composición de la biomasa lignocelulósica y los componentes principales de la lignina, hemicelulosa y celulosa.

**Figura 2.** Composición de la biomasa lignocelulósica.



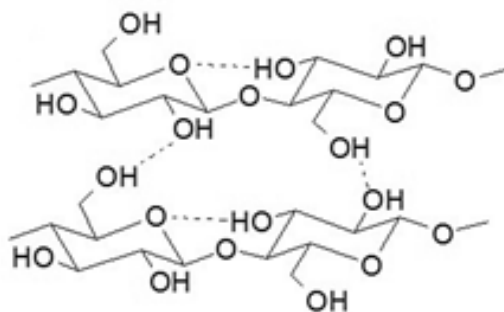
Adaptado de “Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges”, por (Bhatia, y otros, 2020).

Además, el material lignocelulósico puede poseer unos componentes secundarios denominados extractos, los cuales presentan bajo peso molecular y son hidrosolubles o extraíbles en solventes orgánicos (Barroso, 2010). La variación de la proporción de estos componentes está ligado al tipo de material, como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** *Composición estructural de residuos agrícolas.*

| Biomasa                  | Composición lignocelulósica (%) |              |         |       | Referencias              |
|--------------------------|---------------------------------|--------------|---------|-------|--------------------------|
|                          | Celulosa                        | Hemicelulosa | Lignina | Otros |                          |
| Paja de maíz             | 36                              | 28           | 29      | 7     | (Moncada & Castro, 2016) |
| Paja de algodón          | 42                              | 12           | 15      | 31    |                          |
| Paja de arroz            | 41,3                            | 25,7         | 10      | 23    | (Basile & Dalena, 2019)  |
| Paja de avena            | 41,2                            | 27,8         | 17,3    | 13,6  |                          |
| Madera de pino           | 44                              | 26           | 29      | 1     | (Bellido, 2014)          |
| Raquis de palma africana | 38                              | 35           | 22      | -     | (Van Dam, 2016)          |
| Fibras de palma          | 35                              | 32           | 26      | -     |                          |

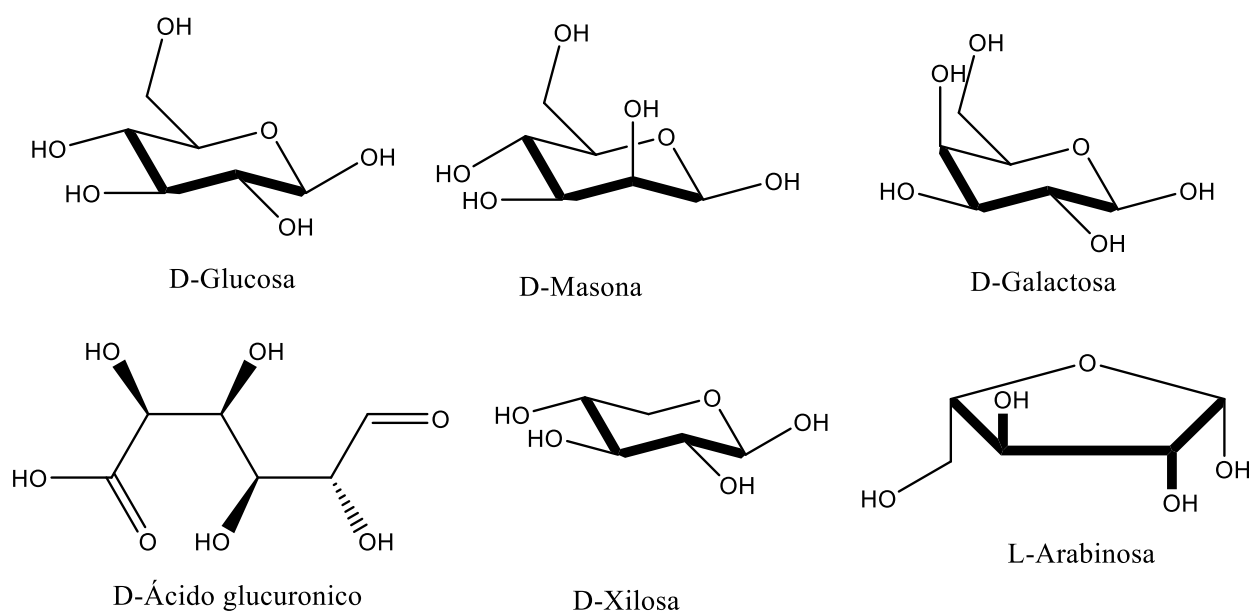
**2.1.2.1. Celulosa.** Polisacárido de peso molecular elevado e insoluble en agua, compuesto por unidades de D-glucosa unidas entre sí por enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos, estructuralmente consta de una parte amorfa y otra cristalina (organizada), la cual le confiere protección a la célula y constituye un implemento estérico al ataque de reactivos (Hernández, Prada, Zapara, & Cardona, 2011).

**Figura 3.** *Estructura de la celulosa.*

Tomado de “Cellulose structure and property changes indicated via wetting-drying cycles”, por (Cichosz & Masek, 2019).

**2.1.2.2. Hemicelulosa.** Conjunto de carbohidratos que forman una estructura polimérica compleja y ramificada, está compuesta por la unión de diferentes unidades de pentosas, hexosas y ácidos de estos azúcares. La función de la hemicelulosa es brindar rigidez a la estructura vegetal (Hernández, Prada, Zapara, & Cardona, 2011).

**Figura 4.** Estructura de los principales componentes de la hemicelulosa.

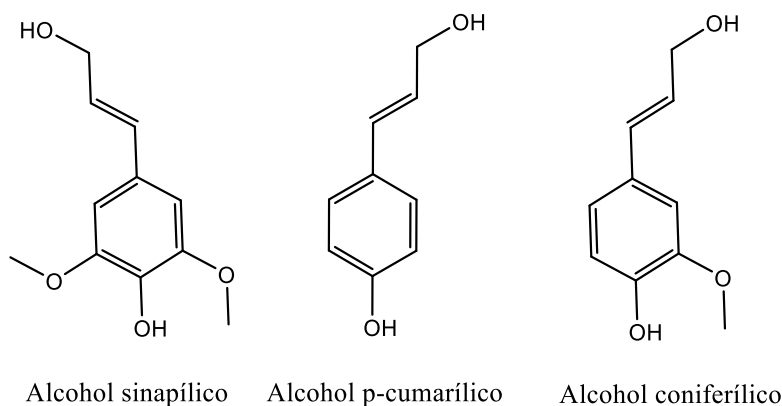


Adaptado de “Cereal Straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels”, por (Sun, 2010, págs. 74-76).

**2.1.2.3. Lignina.** Polímero ramificado, amorfo y heterogéneo que cumple la función de mantener unidos la celulosa y la hemicelulosa entre sí, que, debido a los polímeros fenólicos reticulados en su estructura, proporciona rigidez a la pared celular y evita la acción de los microorganismos. Está compuesto principalmente por tres tipos de monómeros: alcohol sinapílico,

alcohol p-cumarílico y alcohol coniferílico (Yousuf, Pirozzi, & Sannino, 2019) (Hernández, Prada, Zapara, & Cardona, 2011).

**Figura 5.** Estructura de los principales compuestos de la lignina.



Adaptado de “Cereal Straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels”, por (Sun, 2010, págs. 71-72).

### 2.1.3. Cascarilla de café

El fruto de café está constituido por una piel suave, con capa externa dura o epicarpio, de color verde (fruto inmaduro) o color rojizo (fruto maduro). El epicarpio abarca una pulpa fibrosa o mesocarpio. Esto seguido por una capa altamente hidratada de mucílago (llamado también capa de pectina). Por último, la piel o pergamino que cubre cada hemisferio del grano de café, se conoce como la cascarilla de café (Barón, 2014). En la Figura 6 se muestra la estructura del grano de café.

**Figura 6.** Estructura del grano de café.

Tomado de Subproductos del café por (Gomez, 2019).

El pergamino o cascarilla de café representa alrededor del 12% del grano de café en base seca, esta constituye una excelente fuente de celulosa y lignina (Akhtar & Amin, 2012). En la Tabla 2 se muestra la composición de la cascarilla.

**Tabla 2.** Composición de la cascarilla de café

| Composición  | Cantidad (%) |
|--------------|--------------|
| Celulosa     | 24,5         |
| Hemicelulosa | 27,7         |
| Lignina      | 23,7         |
| Extractivos  | 15,6         |
| Otros        | 5,4          |

Adaptado de “Sustainable management of coffee industry by-products and value addition – A review” por (Murthy & Naidu, 2012).

#### **2.1.4. *Bagazo de caña de azúcar***

El bagazo de caña de azúcar es un subproducto o residuo de las centrales azucareras, que resulta luego de la extracción del jugo azucarado de la caña de azúcar (Residuos profesional, 2017). Es una biomasa lignocelulósica constituida principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, que representa aproximadamente entre el 25 y 40% del total de la materia procesada, dependiendo del contenido de fibra de la caña y la eficiencia en la extracción del jugo (Pernalet, Piña, Suárez, Ferrer, & Aiello, 2008). En los últimos años, el bagazo de caña en Colombia ha tenido un aumento en su importancia pasando de ser un simple desecho a convertirse en un subproducto con alto valor agregado, tanto por su contenido de celulosa para la fabricación de papel, plásticos y tableros, como por su valor energético como combustible (Carvajal, 2012). Para el 2019, Colombia tuvo una producción de bioetanol para uso carburante/oxigenante de 444 millones de litros (Sector agroindustrial de la caña, 2019). En la Figura 7 se muestra una imagen del bagazo de caña de azúcar.

**Figura 7.** *Bagazo de caña de azúcar*



Fuente: Autor.

En la Tabla 3 se muestra la composición estructural del bagazo de caña de azúcar.

**Tabla 3.** *Composición del bagazo de caña de azúcar.*

| <b>Composición</b> | <b>Cantidad (%)</b> |
|--------------------|---------------------|
| Celulosa           | 36,9 - 45,7         |
| Hemicelulosa       | 25,6 - 29,6         |
| Lignina            | 18,9 – 26,1         |
| Extractivos        | 5,63                |
| Otros              | 2,84                |

Adaptado de “Influenced of mixel sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition” por (Moraes, Nascimento, Goncalves, Nunes, & Martín, 2015).

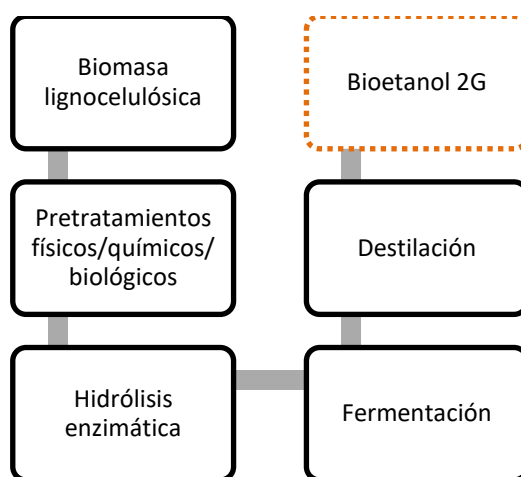
### **2.1.5. Bioetanol**

Es un combustible líquido producido a partir de la fermentación de los azúcares presentes en la biomasa (Dufey, 2006), que puede reemplazar la gasolina en porcentajes bajos para su uso en motores de vehículos ordinarios o puede usarse en niveles de mezcla más altos (85-100% en Brasil) en motores ligeramente modificados como los provistos en vehículos de combustible flexible (Monteiro, Barbosa, Ferreira, Trindade, & Derengowski, 2016). Además, el etanol posee aplicaciones industriales, químicas y en bebidas. Existen tres tipos de bioetanol, que dependen del tipo de biomasa empleada para su obtención. El bioetanol de primera generación (1G) proviene de plantas y vegetales alimenticios. El bioetanol de segunda generación (2G), proviene de desechos agroindustriales y no compite con la producción de alimentos. El etanol de tercera generación (3G) es obtenido a partir de plantas y vegetales no alimenticios y de rápido crecimiento como lo son pastos, algas y algunas cortezas de árboles.

La producción de bioetanol otorga beneficios ambientales, económicos y sociales como la generación de empleos formales, reduce la dependencia a los combustibles fósiles, mitiga el impacto de las emisiones de CO<sub>2</sub> y gases efecto invernadero. Estadísticamente hablando, se indica

que por cada kilogramo quemado de petróleo son emitidos a la atmósfera 7,1 kilogramos de  $\text{CO}_2$ , a diferencia del bioetanol, el cual por cada kilogramo quemado son emitidos 0,9 kilogramos de  $\text{CO}_2$  (Álvarez, 2009). Además, el etanol contiene un 34,7% de oxígeno que da como resultado un 15% más de eficiencia en la combustión que la gasolina. En el bioetanol de segunda generación, el sustrato está compuesto por biomasa lignocelulósica y su proceso de obtención se divide en varias etapas como se muestra en la Figura 8.

**Figura 8.** *Proceso general de obtención de bioetanol 2G.*



Adaptado de "Ethanol" por (Basile, Lulianelli, Dalena, & Veziroglu, 2018, pág. 31).

### 2.1.6. Pretratamientos

El objetivo del proceso de pretratamientos es preparar la biomasa lignocelulósica para la hidrólisis enzimática y conversión efectiva de celulosa y hemicelulosa en bioetanol. Los pretratamientos se pueden clasificar en físicos, químicos y biológicos y combinados. Siendo los tratamientos fisicoquímicos los que son mayormente empleados, ya que combinan la reducción del tamaño de la biomasa y la cristalinidad de los tratamientos físicos, mediante la molienda o trituración (Tian, Zhao, & Chen, 2018), con los diversos tratamientos químicos que pueden ser en medios ácidos, alcalinos u oxidativos, expansión de fibra de amoníaco (AFEX), extracción con

solventes orgánicos, el uso de líquidos iónicos o fluidos supercríticos entre otros (Costa, Furlan, Cruz, de Lima, & de Campos, 2014). En la Tabla 4 se muestran algunos pretratamientos con sus ventajas y desventajas.

**Tabla 4.** *Tipos de pretratamientos sobre biomasa lignocelulósica.*

| <b>Método de pretratamiento</b> | <b>Ventajas</b>                                                                                                                                         | <b>Desventajas</b>                                                                | <b>Referencias</b>       |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Alcalino                        | Eficiente remoción de lignina y baja formación de inhibidores.                                                                                          | Altos costos de catálisis y alteración de la estructura de la lignina             | (Brodeur, y otros, 2011) |
| Ácido                           | Alto rendimiento de glucosa y hemicelulosa solubilizada.                                                                                                | Altos costos de equipos resistentes a la corrosión y formación de inhibidores.    |                          |
| Solventes verdes                | Hidrólisis de lignina y hemicelulosa.                                                                                                                   | Solventes de alto costo. Necesidad de recuperación de solventes.                  |                          |
| Explosión de fibra de amoníaco  | Alta efectividad para material herbáceo y biomasa con bajo contenido de lignina. Baja formación de inhibidores. Aumenta la accesibilidad de la celulosa | Necesidad de reciclar el amoníaco. Poco efectivo con altos contenidos de lignina. |                          |
| Fluidos supercríticos           | Baja degradación de azúcares. Aumento del área accesible de celulosa.                                                                                   | Requisitos de alta presión.                                                       |                          |
| Líquidos iónicos                | Reutilizable y solubiliza eficazmente la lignocelulosa.                                                                                                 | Fuerte tendencia a desnaturalizar la enzima. Costoso.                             | (Bhatia, y otros, 2020)  |

| Método de pretratamiento                                          | Ventajas                                                                                                               | Desventajas                                  | Referencias             |
|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------|
| CO <sub>2</sub> supercrítico                                      | Mejora la hidrólisis de la celulosa. No forma compuestos inhibidores. Fácil recuperación. No modifica la hemicelulosa. | Requisitos de alta presión.                  |                         |
| Deslignificación pronunciada a baja temperatura (LTSD)            | Alta tasa de conversión y rendimiento.                                                                                 | Pueden generarse productos tóxicos. Costoso. | (Bhatia, y otros, 2020) |
| Fraccionamiento lignocelulósico mejorado con co-disolvente (CELF) | Reducción de la recalcitrancia de la biomasa. Disolventes renovables de bajo punto de ebullición.                      | Costoso                                      |                         |

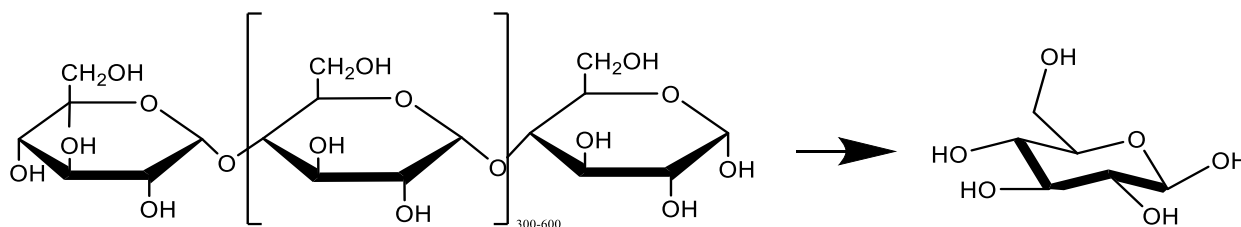
**2.1.6.1. Pretratamiento oxidativo.** El pretratamiento oxidativo implica el tratamiento del material vegetal mediante el uso de oxidantes como el oxígeno, el ozono y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Este pretratamiento da como resultado la escisión de la lignina rompiendo los enlaces carbono-carbono presentes en ella, aumentando su solubilidad, además de la degradación de la hemicelulosa en sus monómeros más simples y reduciendo la cristalinidad de la celulosa. El peróxido de hidrógeno al reaccionar con la lignina forma un fragmento soluble, separando así la lignina de la biomasa lignocelulosa, lo que mejora la digestibilidad de la enzima. El tratamiento oxidativo produce un material pretratado adecuado para lograr una alta conversión enzimática, sin generar inhibidores de fermentación (Bittencourt, Barreto, Brandao, Lobo, & Alves, 2019) (Kumar, Bhardwaj, Agrawal, Chaturvedi, & Verma, 2020).

### 2.1.7. Hidrólisis enzimática

Después del pretratamiento, la celulosa y la hemicelulosa se hidrolizan a monómeros mediante una hidrólisis enzimática. La hidrólisis se realiza para descomponer la estructura compleja de la celulosa y hemicelulosa en monómeros (azúcares simples), que luego pueden ser utilizados por los microorganismos en la fermentación a bioetanol.

La glucosa se obtiene de la celulosa, mientras que la hemicelulosa libera una mezcla de pentosas y hexosas. La hidrólisis se lleva a cabo utilizando enzimas durante un período de tiempo definido a temperaturas específicas para romper la celulosa y la hemicelulosa en azúcares monoméricos como se describe en la Figura 9. La hidrólisis sin pretratamiento produce rendimientos inferiores del 20%, mientras que los rendimientos sobre el material pretratado a menudo llegan al 90% (Basile, Lulianelli, Dalena, & Veziroglu, 2018).

**Figura 9.** Conversión de celulosa a glucosa.



Adaptado de “Ethanol” por (Basile, Lulianelli, Dalena, & Veziroglu, 2018, pág. 37).

### 2.1.8. Reactores químicos

La búsqueda de nuevas fuentes de energía renovable ha incrementado el número de investigación en nuevas tecnologías que permitan el aprovechamiento de residuos de biomasa con composición lignocelulósica para producción de biocombustibles (Bimestre, Mantovani, Botura, Canettieri, & Tuna, 2010). La implementación de reactores químicos en la etapa de pretratamientos ha permitido obtener mejores rendimientos en la hidrólisis enzimática y posterior obtención de

bioetanol. Debido al aumento de las investigaciones y desarrollo de reactores a escala de laboratorio, existen diversos tipos de reactor, entre los cuales se encuentran los de proceso continuo, discontinuo y semicontinuo, siendo los reactores tubulares los principales modelos manejados (horizontal o vertical) (Rodríguez, Sanchez, & Amaya, 2019), que al tener acoplados agitadores permiten una buena homogeneización de la biomasa con el reactivo, mejorando significativamente los rendimientos del pretratamiento.

Los reactores químicos permiten mantener los pretratamientos en condiciones controladas, sin embargo, existen diversos factores que pueden alterar este proceso y se deben tener en cuenta en el momento del desarrollo del reactor. Los factores que pueden influir son el volumen del reactor, la potencia de agitación, la velocidad de transferencia de calor, las concentraciones del reactivo, la cantidad de biomasa que pueda pretratar sin verse afectado el rendimiento, entre otros (Cardona, Quintero, & Paz, 2010).

### ***2.1.9. Técnicas instrumentales***

**2.1.9.1. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).** A partir de la MEB se obtiene información sobre las texturas y objetos en tres dimensiones, permitiendo así la observación y caracterización superficial de materiales tanto orgánicos como inorgánicos. Para obtener una imagen mediante la técnica, la superficie de la muestra se barre a través de un rastreo programado mediante un haz de electrones focalizado que barre la superficie en línea recta, seguido a esto vuelve a su posición inicial, para luego tomar otra dirección (desplazamiento hacia abajo). Dicho

proceso se repite hasta que toda la muestra ha sido barrida, lo cual permitirá la obtención final de una imagen (Skoog, Holler, & Nieman, 2001).

**2.1.9.2. Difracción de Rayos X (DRX).** La difracción de rayos X es una técnica basada en el análisis de las radiaciones emitidas por una muestra (polvo) al ser expuesta a un haz de rayos x divergentes. La reflexión de rayos X producida por la muestra en diferentes ángulos y en haces más o menos intensos permite la distinción de compuestos cristalinos en los que el haz de rayos x ha sido incidido. De los datos arrojados por el análisis se puede obtener el espacio interplanar, los índices de Miller de las reflexiones y su intensidad, la identificación cualitativa de los componentes químicos, el análisis cualitativo de las mezclas de cristales y su medida (Skoog, Holler, & Nieman, 2001).

**2.1.9.3. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).** La cromatografía líquida de alta eficacia es una técnica utilizada para separar los componentes individuales de una muestra. Esta separación se produce mediante las interacciones químicas y físicas de la muestra con las fases móvil y estacionaria. La muestra se desplaza en la fase móvil, esta se hace pasar a través de la fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta

movilidad, los componentes de la muestra se separan en secciones que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente (Skoog, Holler, & Nieman, 2001).

**2.1.9.4. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).** La región del infrarrojo está comprendida entre los 12.800 y 10cm<sup>-1</sup> en el espectro. Para que una molécula absorba radiación en el espectro IR, esta debe resistir un cambio en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento vibracional o rotacional, lo cual permitirá que el campo eléctrico alterno de la radiación interaccione con la molécula y provoque cambios en la amplitud de algunos de sus movimientos. Respecto a las transiciones rotacionales, estas absorben en el espectro a los 100 cm<sup>-1</sup> ya que la energía necesaria para lograr un cambio en los niveles rotaciones es muy poca. Los niveles de energía vibracional se encuentran en el espectro IR medio. Las posiciones atómicas dentro de las moléculas no permanecen fijas, ya que estas oscilando continuamente debido a las variaciones vibracionales y rotacionales que ocurren en los enlaces. Hay dos clases básicas de vibraciones: de tensión (cambio conjunto en la distancia interatómica en el eje de enlace de los átomos) y de flexión (hay un cambio en el ángulo entre dos enlaces), que a su vez se divide en cuatro tipos: de tijereteo, de balanceo, de aleteo y de torsión (Skoog, Holler, & Nieman, 2001).

**2.1.10. Laboratorio Nacional de Energía Renovable (National Renewable Energy Laboratory, NREL)**

NREL es un laboratorio ubicado en los Estados Unidos, donde desarrollan investigaciones sobre la eficiencia energética, teniendo un enfoque en el transporte sostenible, la producción de energía renovable y sistemas de integración, entre otros. Dentro de los temas de investigación que manejan se encuentra el estudio estructural de la biomasa, a partir de la cual están desarrollando

nuevas tecnologías para convertirla en combustibles, y bioproductos que reduzcan la dependencia que existe actualmente con el petróleo, por lo cual NREL ha creado diversos protocolos para la caracterización fisicoquímica de la biomasa (National Renewable Energy Laboratory, s.f.).

## 2.2. Marco de Antecedentes

En el artículo titulado “Optimization study on the hydrogen peroxide pretreatment and production of bioethanol from seaweed *Ulva prolifera* biomass” publicado en el año 2016 por Li y colaboradores, evaluaron el efecto del pretratamiento con peróxido de hidrógeno sobre algas marinas y su viabilidad para la producción de bioetanol. Para ello, realizaron un análisis estadístico evaluando condiciones de concentración de reactivo (0,1, 0,2, 0,5, 1 y 2%), pH (4, 6, 8, 10), duración del tratamiento (6, 12, 24 horas) y temperatura (50, 70 y 90°C). Los resultados indicaron que la implementación del pretratamiento mejoró la eficiencia de la hidrólisis enzimática en comparación con la biomasa no pretratada, alcanzando un rendimiento de azúcares reductores y glucosa de 7,1g/L y 3,2g/L, respectivamente. Las condiciones óptimas para el pretratamiento fueron de 12h, 50°C y 0,2% de peróxido de hidrógeno bajo un pH ácido de 4, obteniendo una deslignificación del 93% (Li, y otros, 2016).

En el artículo titulado “Recycling the liquid fraction of alkaline hydrogen peroxide in the pretreatment of corn stover” publicado en el año 2017 por Alves y colaboradores, evaluaron la influencia del pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino sobre residuos de maíz, manejando muestras de 25g de biomasa en una solución de 250mL a 7,5% v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con pH ajustado de 11 utilizando NaOH (5M), a una proporción 1:10, en un erlenmeyer de 2L durante una hora a 150rpm, en una mesa de incubadora rotativa a 25°C. Los resultados indicaron que el pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino actúa principalmente sobre la lignina y

hemicelulosa obteniendo una reducción del 77 y 52%, respectivamente. Además de la reducción del índice de cristalinidad de la celulosa y aumentos en los rendimientos de la hidrólisis enzimática (Alves, y otros, 2017).

En el artículo titulado “Bioethanol production from wheat Straw by phosphoric acid plus hydrogen peroxide (PHP) pretreatment via simultaneous saccharification and fermentation (SSF) at high solid loadings” publicado en 2018 por los autores Qiu y colaboradores, evaluaron la producción de bioetanol a partir de paja de trigo pretratada con una solución compuesta (PHP) de  $\text{H}_2\text{PO}_4$  al 79,6% p/p y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 1,9%. Manejaron 10g de biomasa base seca con 100mL de la solución PHP. El pretratamiento lo realizaron en un reactor manteniendo una agitación de 180 rpm a una temperatura de 40,2°C durante 2,9 h. Los resultados del pretratamiento indican que hubo una remoción del 100% de la hemicelulosa y 70,8% de des lignificación contenida en la biomasa, además del aumento del tamaño del poro y la superficie específica del sustrato, lo que permite facilitar la accesibilidad de la celulosa a las enzimas (Qiu, y otros, 2018).

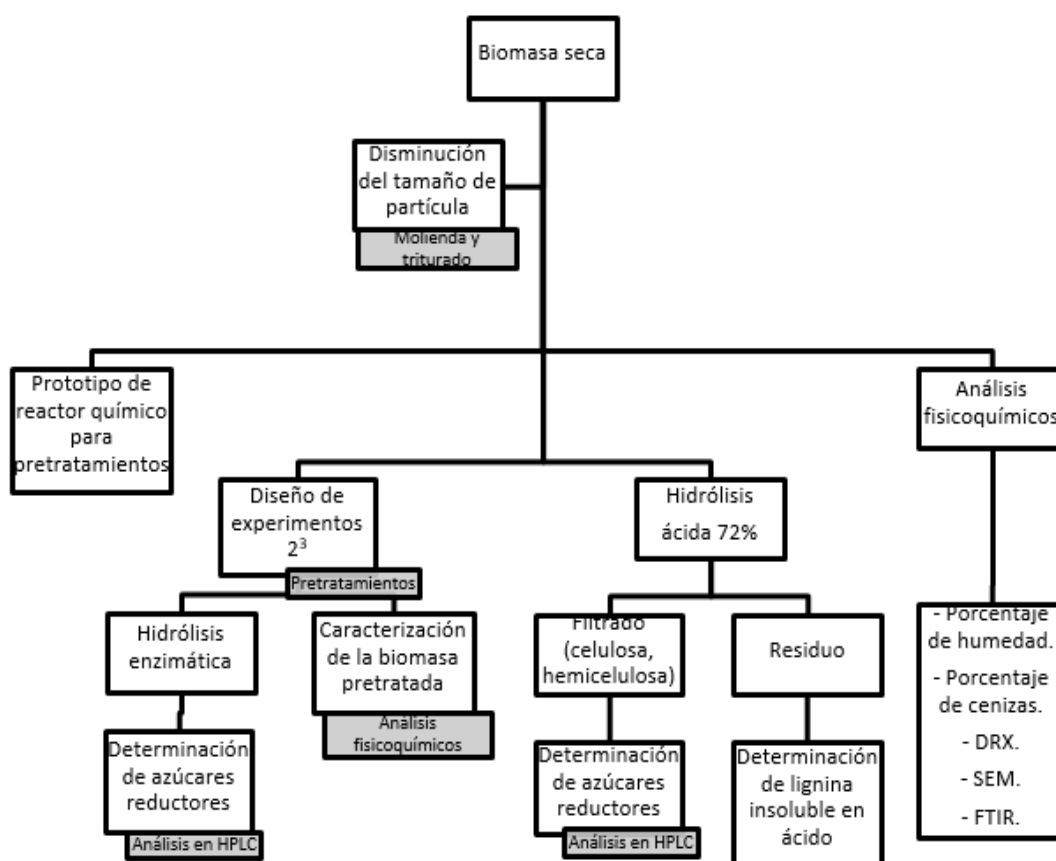
En el artículo titulado “Improving the enzymatic hydrolysis of larch by coupling water pre-extraction with alkaline hydrogen peroxide post-treatment and adding enzyme cocktail” publicado en 2019 por Tang y colaboradores, evaluaron el pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino (AHP) sobre la madera del árbol Alerce (*Larix spp.*). Los pretratamientos de AHP los llevaron a cabo en reactores de acero inoxidable sellados, realizando varios ensayos, cada uno durante 30 minutos a 170, 180 y 190°C, con una variable de 0-4% v/v en la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y una relación constante de sólido-líquido de 1:10, manteniendo el pH en 11 utilizando 50% p/v de NaOH. Los resultados indicaron que los rendimientos mejoraban con el aumento de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la temperatura, logrando una remoción de lignina del 79% a condiciones de 190°C y concentración de peróxido del 4%. Por su parte, el rendimiento de la hidrólisis

enzimática de la biomasa pretratada a esas condiciones, fue del 81% después de 72 horas (Tang, y otros, 2019).

En el presente año, en el artículo titulado “Modified alkaline peroxide pretreatment: An efficient path forward for bioethanol production from bamboo” publicado por Huang y colaboradores, evaluaron el rendimiento del pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino más la adición de etanol en el sistema de reacción. Los ensayos se llevaron a cabo evaluando varias concentraciones de  $H_2O_2$  (2,2, 0,4 y 0,1%) a temperaturas entre 40 y 100°C, manejando 20g de bambú en la proporción sólido-líquido de 1:10 (p:v), todo se realizó a un tiempo de reacción constante de 1 hora. Los resultados revelaron que los rendimientos del pretratamiento mejoraban con el aumento de la concentración de  $H_2O_2$  y la temperatura, obteniendo una remoción de lignina del 79% a 100°C y concentración de  $H_2O_2$  y etanol del 3 y 1%, respectivamente. Por su parte, la eficiencia de la hidrólisis enzimática de la biomasa pretratada bajo esas condiciones, fue del 97% (Huang, y otros, 2020).

### **3. Método**

El desarrollo experimental se llevó a cabo de acuerdo con lo mostrado en la Figura 10.

**Figura 10.** *Diseño metodológico*

Fuente: Autor.

La metodología planteada en este trabajo se basó en los protocolos establecidos por el Laboratorio Nacional de Energías Renovables por sus siglas en inglés NREL, los protocolos usados se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** *Protocolos NREL.*

| Procedimiento                                                     | Protocolo         |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Determinación de humedad                                          | NREL/TP-510-42621 |
| Determinación de cenizas                                          | NREL/TP-510-42622 |
| Determinación de carbohidratos estructurales y lignina en biomasa | NREL/TP-510-42618 |

Fuente: Autor.

### 3.1. Determinación de humedad

Se pesaron 5 gramos de muestra en base seca en una caja petri previamente tarada y se introdujo en un horno durante 4 horas a 105°C. Finalizado el tiempo, se dejó enfriar en un desecador hasta temperatura ambiente (Sluiter, y otros, 2018). Por último, se pesó la muestra, la determinación de humedad se realizó por triplicado. La humedad de la biomasa se calculó empleando la siguiente ecuación:

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

Donde:

**M<sub>a</sub>**: peso caja petri + muestra seca.

**M<sub>b</sub>**: peso caja petri

**M<sub>c</sub>**: peso caja petri + muestra húmeda.

### 3.2. Determinación de cenizas

Se calentaron los crisoles en una mufla a 575°C durante 4 horas, finalizado el tiempo, se dejaron enfriar en un desecador hasta temperatura ambiente y se registró su peso. Posteriormente, se pesaron 2 gramos de muestra en base seca en un crisol previamente tarado, seguido a esto, se introdujo en la mufla. Se tuvo en cuenta la siguiente rampa de temperatura, estableciendo la temperatura inicial en 105°C:

- Temperatura a 105°C durante 12 minutos.
- Se subió la temperatura a 250°C (10°C por minuto).
- Se mantuvo la temperatura en 250°C durante 30 minutos.
- Se aumentó la temperatura a 575°C (20°C por minuto).
- Se mantuvo la temperatura a 575°C durante 180 minutos).

- Se disminuyó la temperatura a 105°C.

Finalizado el proceso anteriormente mencionado, se retiró el crisol contenedor de la muestra, se dejó enfriar en un desecador hasta temperatura ambiente y se registró su peso. Se realizó el procedimiento por triplicado hasta tener un peso constante (Sluiter, y otros, 2005). El porcentaje de cenizas se calculó empleando la siguiente ecuación:

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

### 3.3. Determinación de lignina

Se pesaron 300 mg de muestra en base seca y se depositaron en un tubo de ensayo, luego se adicionaron 3 mL de una solución de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 72% y se mezclaron de manera homogénea. Posteriormente, se introdujo el tubo de ensayo en un baño de agua a 30°C durante una hora y se agitó la muestra cada 5 minutos sin retirar del baño de agua. Finalizado el tiempo, se diluyó a una concentración del 4% mediante la adición de 84 mL de agua desionizada. Esta solución se empleó para la determinación de lignina soluble en ácido (LSA), lignina insoluble en ácido (LIA) y en la determinación de carbohidratos estructurales (Sluiter, y otros, 2011).

El porcentaje de lignina de las biomásas manejadas se obtendrá mediante la suma de los valores de lignina soluble e insoluble en ácido, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\% \text{lignina} = \%LIA + LSA$$

#### 3.3.1. Determinación de lignina insoluble en ácido (LIA)

Se filtró la solución obtenida en el procedimiento anterior (numeral 3.3) empleando un papel de filtro previamente pesado. Se tomó una alícuota de 50 mL para el análisis de lignina soluble y determinación de carbohidratos estructurales.

Se lavaron los sólidos presentes en el papel filtro hasta obtener un pH neutro y se secaron a 105°C durante 4 horas. Finalizado el tiempo, se dejaron enfriar en un desecador hasta temperatura ambiente y se registró su peso. Por último, se realizó el procedimiento de determinación de cenizas (numeral 3.2) (Sluiter, y otros, 2011). El porcentaje de lignina insoluble en ácido se calculó empleando la siguiente ecuación:

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

Donde:

**M<sub>a</sub>**: peso papel filtro + muestra.

**M<sub>b</sub>**: peso papel filtro.

**M<sub>c</sub>**: peso de la muestra.

### 3.3.2. Determinación de lignina soluble en ácido (LSA)

Diluyendo la alícuota previamente almacenada y empleando un espectrofotómetro UV-vis, se midió la absorbancia de la disolución, a una longitud de onda de 280nm y se registró su valor (Sluiter, y otros, 2011). El porcentaje de lignina soluble en ácido se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$\%LSA = \left( \frac{UV_{abs} * Volumen filtrado * Dilución}{\epsilon * muestra ODW} \right) * 100$$

Donde:

**UV<sub>abs</sub>**: promedio de absorbancia UV-vis para la muestra a 320nm.

**ε**: absorbancia de la biomasa en la longitud de onda específica (valor recomendado por NREL).

### 3.4. Determinación de carbohidratos estructurales

Se prepararon curvas de calibrado para un conjunto de estándares de calibración (D-(+)-glucosa, D-(+)-xilosa, D-(+)-arabinosa y celobiosa), los cuales fueron analizados en un equipo de HPLC Agilent 1200, bajo las siguientes condiciones:

- Columna: Agilent ZORBAX Carbohydrate Analysis Column.
- Detector: Agilent 1200 Series Refractive Index Detector.
- Volumen de inyección: 5µL.
- Fase móvil: acetonitrilo-agua desionizada (75:25).
- Rango de flujo: 0,8 mL/minuto.
- Temperatura de la columna: 30°C.
- Tiempo: 12 minutos.

En un tubo de ensayo de adición 5 mL de la alícuota almacenada del procedimiento anterior (numeral 3.3.1) y se neutralizó con una solución de carbonato de calcio hasta obtener un pH 5-6, luego se centrifugó la muestra con el fin de asentarla y decantarla. Por último, se filtró el líquido a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenó en un vial automuestreador, procedimiento al análisis en el HPLC. Se tuvo en cuenta la concentración de D-(+)-glucosa y celobiosa para calcular la celulosa presente en las muestras y la concentración de D-(+)-arabinosa y D-(+)-xilosa para calcular la hemicelulosa de las muestras (Sluiter, y otros, 2011).

Se calculó el porcentaje de azúcares en la biomasa empleando la siguiente ecuación:

$$\%ART = \left( \frac{C_{ART} * V_{Filtrado} * FC}{g_{muestra}} \right)$$

Donde:

**C<sub>ART</sub>**: concentración del azúcar empleando la curva de calibrado.

**FC:** factor de corrección para determinar la concentración polimérica de los azúcares dada la concentración de los azúcares monoméricos (glucosa: 0,9, celobiosa: 0,95, xilosa: 0,88, arabinosa: 0,88).

**V<sub>Filtrado</sub>:** 0,087L.

**g<sub>muestra</sub>:** gramos usados en el procedimiento para la determinación de lignina (300 mg – 0,3 g).

### 3.5. Caracterización por técnicas instrumentales

#### 3.5.1. Caracterización por Difracción de Rayos X (DRX)

Este análisis permitió calcular el índice de cristalinidad de la celulosa, empleando la siguiente ecuación:

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

Donde:

**I<sub>c</sub>:** índice de cristalinidad.

**I<sub>002</sub>:** intensidad del pico cristalino #002.

**I<sub>am</sub>:** intensidad del pico en la fase amorfa.

#### 3.5.2. Caracterización por microscopia electrónica de barrido

Esta caracterización permitió analizar la superficie del material lignocelulósico antes, después del pretratamiento e hidrólisis.

#### 3.5.3. Caracterización por Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Esta caracterización permitió realizar la identificación de los grupos funcionales presentes en la pared celular de las biomásas manejadas.

### 3.6. Diseño de experimentos 2<sup>3</sup> para evaluar el desempeño del pretratamiento con peróxido de hidrógeno

Los valores codificados en los niveles de cada una de las variables a estudiar en el diseño experimental se presentan en la Tabla 6:

**Tabla 6.** Rango de valores estudiados en el diseño experimental factorial completo del pretratamiento con peróxido de hidrógeno 2<sup>3</sup>.

| Ítems                                      | Niveles |    |    |
|--------------------------------------------|---------|----|----|
| Factor                                     | -1      | 0  | +1 |
| Tiempo (minutos)                           | 40      | 60 | 80 |
| Concentración de peróxido de hidrógeno (%) | 3       | 9  | 15 |
| Temperatura (°C)                           | 25      | 45 | 65 |

Fuente: Autor.

Los pretratamientos se llevaron a cabo pesando 15 gramos de biomasa en base seca con 250 mL de una solución de peróxido de hidrógeno alcalino a las concentraciones, tiempo y temperatura, determinadas por el diseño experimental. Los ensayos se llevaron a cabo en un erlenmeyer de 500 mL, con agitación constante de 150 rpm empleando un agitador magnético.

**Tabla 7.** Condiciones de los ensayos del pretratamiento.

| Ensayo | Tiempo (min) | Temperatura (°C) | Concentración (%) |
|--------|--------------|------------------|-------------------|
| 1      | 80           | 65               | 3                 |
| 2*     | 60           | 45               | 9                 |
| 3      | 40           | 65               | 15                |

|     |    |    |    |
|-----|----|----|----|
| 4   | 80 | 25 | 15 |
| 5*  | 60 | 45 | 9  |
| 6   | 40 | 25 | 15 |
| 7   | 40 | 65 | 3  |
| 8   | 80 | 25 | 3  |
| 9   | 80 | 65 | 15 |
| 10  | 40 | 25 | 3  |
| 11* | 60 | 45 | 9  |

*Nota:* \* Triplicado del diseño experimental. Fuente: Autor.

Finalizado los tiempos de reacción, los líquidos reaccionables fueron descartados y los residuos sólidos restantes se lavaron con agua para retirar el exceso de reactivos, luego fueron secados en un horno a 105°C para eliminar la presencia de agua y finalmente se registró su peso.

El rendimiento del pretratamiento para cada ensayo se determinó calculando el porcentaje de pérdida de masa por parte de las biomاسas después del pretratamiento, empleando la siguiente ecuación:

$$\%R = \left( \frac{M_i - M_f}{M_i} \right) * 100$$

Donde:

**M<sub>i</sub>**: masa inicial.

**M<sub>f</sub>**: masa final.

Los sólidos fueron analizados por FTIR, SEM, DRX y llevados a la etapa de hidrólisis enzimática.

### 3.7. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo a las biomasas (cascarilla de café y bagazo de caña de azúcar) de los 11 ensayos de cada diseño de experimentos. Se preparó una solución de tampón citrato de sodio a pH 5,5. La hidrólisis se realizó en erlenmeyer de 250 mL ubicados en un shaker, en los cuales se adicionaron las enzimas (Cellic CTec2 y HTec2), la biomasa pretratada y la solución tampón. Las condiciones de la hidrólisis enzimática se consignan en la Tabla 8.

**Tabla 8.** *Condiciones de hidrólisis enzimática.*

| Condiciones             | Valores |
|-------------------------|---------|
| Temperatura             | 50°C    |
| pH                      | 5       |
| Tiempo de hidrólisis    | 72 h    |
| Relación biomasa-enzima | 1:3 m:v |

Finalizado las 72 horas, las muestras se llevaron a un baño termostatado a 100°C durante 15 minutos para la inactivación de las enzimas. Posteriormente, las muestras se filtraron a vacío para separar el licor de hidrólisis de los sólidos restantes. Finalmente, el licor se llevó a análisis por HPLC para determinar la concentración de glucosa obtenida. Los residuos sólidos se lavaron con agua, se pesaron y se caracterizaron por DRX y SEM.

El rendimiento de la hidrólisis para cada ensayo se determinó calculando el porcentaje de pérdida de masa por parte de las biomasas después de la hidrólisis enzimática, empleando la siguiente ecuación:

$$R = \left( \frac{M_i - M_f}{M_i} \right) * 100$$

Donde:

**M<sub>i</sub>:** masa inicial.

**M<sub>f</sub>:** masa final.

### **3.8. Desarrollo de un prototipo de reactor químico para pretratamientos de biomاسas**

Mediante análisis bibliográficos y con los resultados obtenidos en la etapa de pretratamiento, se diseñó el prototipo de un reactor químico vertical a escala de laboratorio, haciendo énfasis en el sistema de agitación. Por último, se realizaron recomendaciones para su implementación.

## **4. Resultados y discusión**

El bagazo de caña de azúcar usado en este trabajo fue recolectado de la finca Bore sur, ubicada a una altitud de 1005 msnm, situada en el municipio de Piedecuesta, vía San Gil departamento de Santander, la cual tiene una cosecha de caña de azúcar panelera. Por su parte, la cascarilla de café fue recolectada de la hacienda el roble ubicada a una altitud de 1650 msnm, situada en la mesa de los santos departamento de Santander, la cascarilla de café proporcionada fue obtenida de los diversos tipos de café cosechados en la hacienda.

### **4.1. Determinación de la composición del bagazo de caña de azúcar y la cascarilla de café**

#### ***4.1.1. Determinación del porcentaje de humedad***

El contenido de humedad en una biomasa lignocelulósica es la cantidad de agua presente en esta, expresada como un porcentaje de su peso (Isern, 2014). Para su cálculo se empleó el

protocolo NREL/TP-510-42618 del laboratorio nacional de energías renovables y los resultados para la cascarilla de café y el bagazo de caña se consignan en la Tabla 9.

**Tabla 9.** *Porcentaje de humedad de la cascarilla de café y bagazo de caña*

| <b>Biomasa</b>           | <b>Porcentaje de humedad (%)</b> |
|--------------------------|----------------------------------|
| Cascarilla de café       | 10,07 ± 0,09                     |
| Bagazo de caña de azúcar | 9,38 ± 0,07                      |

Fuente: Autor.

Como se puede observar en la Tabla 9, el valor obtenido para la cascarilla de café es de 10,07%, este porcentaje se encuentra dentro del rango reportado en la literatura que oscila entre 8,6-15% (Arias & Meneses, 2016) (Murthy & Naidu, 2012). Por su parte, el porcentaje de humedad para el bagazo de caña de azúcar fue de 9,3%, valor que también se encuentra dentro del rango reportado en la literatura que oscila entre 7,5-9,4% (Menezes, Rocha, & Filho, 2016). Sin embargo, cabe resaltar que las variaciones en el porcentaje de humedad para las biomosas, especialmente para la cascarilla, pueden ser debido a la variedad de café, zonas de cultivos, tipo de secado y almacenamiento del material lignocelulósico.

#### **4.1.2. Determinación del porcentaje de cenizas**

Para el cálculo del porcentaje de cenizas se empleó el protocolo NREL/TP-510-42622 del laboratorio nacional de energías renovables y los resultados para el bagazo de caña y la cascarilla de café se consignan en la Tabla 10.

**Tabla 10.** *Porcentaje de cenizas de la cascarilla de café y bagazo de caña*

| <b>Biomasa</b>     | <b>Porcentaje de cenizas (%)</b> |
|--------------------|----------------------------------|
| Cascarilla de café | 3,16 ± 0,19                      |

|                          |             |
|--------------------------|-------------|
| Bagazo de caña de azúcar | 1,58 ± 0,30 |
|--------------------------|-------------|

Fuente: Autor.

Según la literatura, el contenido de cenizas reportado para el bagazo de caña de azúcar puede variar de 1-9% (Anu, Kumar, Kumar, & Singh, 2021), mientras que para la cascarilla de café su contenido de cenizas oscila entre 5,4-6,2% (Murthy & Naidu, 2012). En la Tabla 10 se puede observar que el valor obtenido para el bagazo de caña de azúcar fue de 1,58%, resultado que se encuentra dentro del rango anteriormente mencionado. Por su parte, el valor obtenido para la cascarilla de café fue de 3,16%, resultado que se encuentra por debajo del rango reportado, esta diferencia probablemente es debida a la exposición mineral que tiene la biomasa al entrar en contacto con el suelo en los procesos de colecta que tiene el café y al manejo y disposición que se le da al material lignocelulósico residual. Sin embargo, se destaca que ambas biomásas presentan un contenido de cenizas inferior al 10%, ya que altos contenidos de cenizas en el material lignocelulósico pueden interferir en la producción del biocombustible debido a la composición misma de la ceniza (Melissari, 2012).

#### 4.1.3. Determinación del porcentaje de lignina

Para el cálculo del porcentaje de lignina soluble e insoluble y lignina total de las biomásas se empleó el protocolo NREL/TP-510-42618 del laboratorio nacional de energías renovables y los resultados para el bagazo de caña de azúcar y la cascarilla de café se consignan en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Porcentajes de lignina soluble, insoluble y total del bagazo de caña de azúcar y la cascarilla de café

| Biomasa                  | LIA (%)      | LSA (%)     | LT (%)       |
|--------------------------|--------------|-------------|--------------|
| Bagazo de caña de azúcar | 20,67 ± 0,24 | 7,35 ± 0,44 | 28,02 ± 0,41 |

|                    |              |             |              |
|--------------------|--------------|-------------|--------------|
| Cascarilla de café | 14,66 ± 1,16 | 7,11 ± 0,15 | 21,77 ± 1,31 |
|--------------------|--------------|-------------|--------------|

Nota: LIA: lignina insoluble en ácido; LSA: lignina soluble en ácido; LT: lignina total.

Fuente: Autor.

La lignina cumple la función de dar soporte y protección a la estructura vegetal y su porcentaje varía según el tipo de biomasa que se esté manejando. En la literatura se reportan valores de lignina para el bagazo de caña de azúcar que oscilan entre 17-32% según (Anu, Kumar, Kumar, & Singh, 2021) y 18-26% según (Moraes, Nascimento, Goncalves, Nunes, & Martín, 2015). En la Tabla 11 se puede observar que para el bagazo de caña de azúcar se obtuvieron valores de lignina soluble e insoluble del 7,35 y 20,67%, respectivamente, para dar un porcentaje de lignina total del 28,02%; este valor se encuentra dentro del rango apropiado en relación a lo descrito por Anu et al. Por su parte, para la cascarilla de café los valores de lignina soluble e insoluble fueron de 7,11 y 14,66%, respectivamente, dando un porcentaje de lignina total del 21,77%, este valor se encuentra por debajo al obtenido por (Bekalo & Reinhardt, 2009) donde reportan un porcentaje de lignina total del 23,7%.

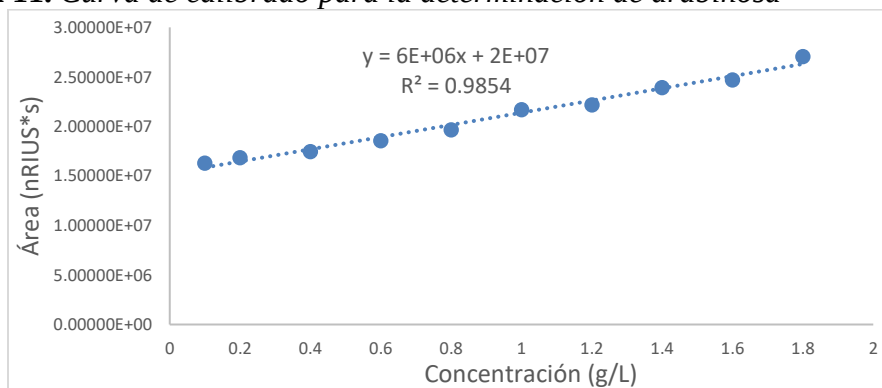
Debido a las interacciones intermoleculares presentes entre la fracción lignocelulósica con la hemicelulosa, las enzimas no pueden acceder de manera fácil a la celulosa y por ende los rendimientos de la hidrólisis se ven reducidos. Por lo tanto, las biomاسas al presentar altos contenidos de lignina, como es el caso del bagazo de caña de azúcar y la cascarilla de café, es necesario realizar procesos de deslignificación mediante una etapa de pretratamientos previo a la hidrólisis enzimática.

#### **4.1.4. Determinación de celulosa y hemicelulosa**

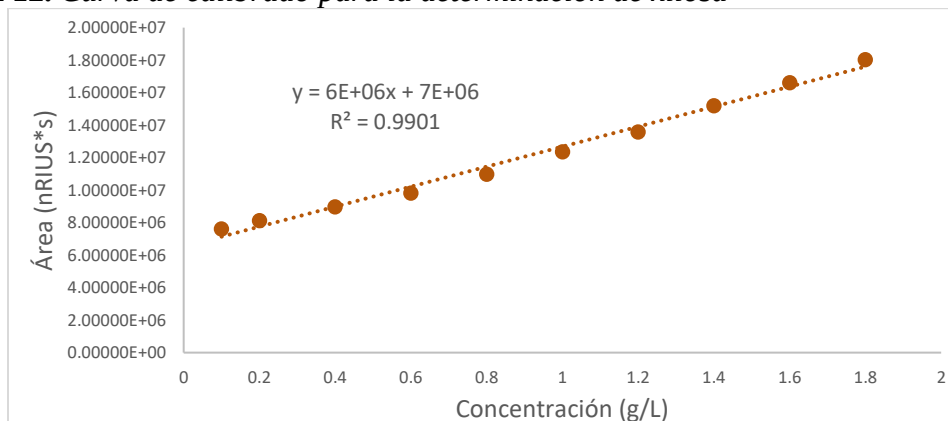
Se empleó el protocolo NREL/TP-510-42618 del laboratorio nacional de energías renovables para la determinación de azúcares y con ello el cálculo de los porcentajes de celulosa

y hemicelulosa en las biomasas. Para ello, se prepararon curvas de calibrado para cada azúcar (arabinosa, celobiosa, glucosa y xilosa) en un intervalo de 0,1-1,8 g/L, los gráficos se muestran a continuación:

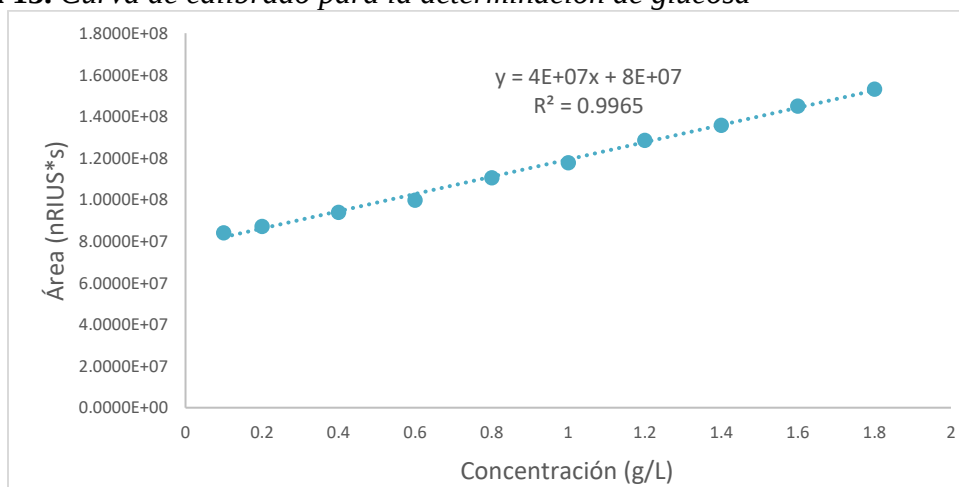
**Figura 11.** Curva de calibrado para la determinación de arabinosa

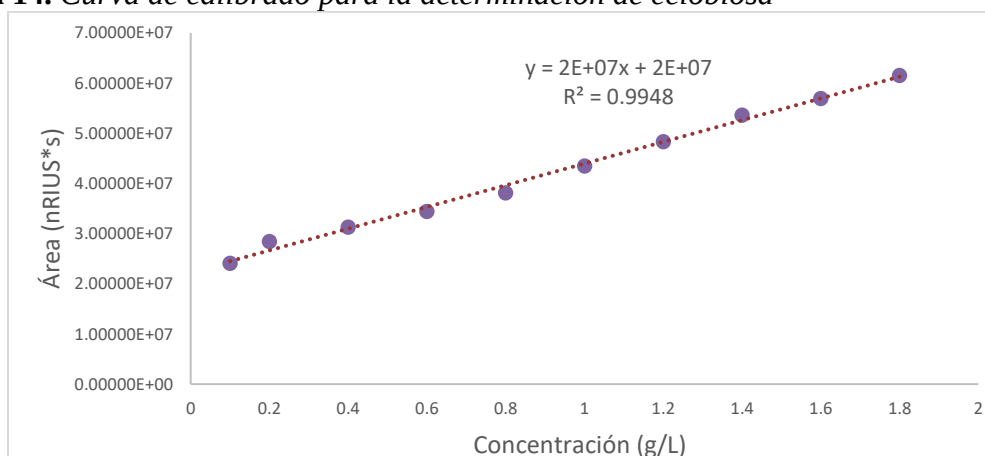


**Figura 12.** Curva de calibrado para la determinación de xilosa



**Figura 13.** Curva de calibrado para la determinación de glucosa



**Figura 14.** Curva de calibrado para la determinación de celobiosa

Se empleó la ecuación de la recta  $y=mx+b$  de cada curva de calibrado para determinar la concentración de cada azúcar presente en las muestras y mediante la fórmula de azúcares reductores totales mostrada en la sección 3.4, se determinó el porcentaje de arabinosa, celobiosa, glucosa y xilosa, estos valores se consignan en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Resultados de porcentajes de azúcares.

| Biomasa                  | Xilosa (%)   | Arabinosa (%) | Glucosa (%)  | Celobiosa (%) |
|--------------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| Bagazo de caña de azúcar | 21,19 ± 2,45 | -             | 32,79 ± 1,61 | -             |
| Cascarilla de café       | 16,49 ± 2,22 | -             | 25,22 ± 1,68 | -             |

Fuente: Autor.

Se obtuvo el porcentaje de celulosa mediante la suma de los porcentajes de glucosa y celobiosa, y para la hemicelulosa se sumaron los porcentajes de xilosa y arabinosa. Los valores obtenidos y los reportados en la literatura se consignan en la Tabla 13 y 14.

**Tabla 13.** *Valores de celulosa y hemicelulosa para el bagazo de caña de azúcar*

| <b>Polímero</b> | <b>Valor experimental (%)</b> | <b>Valor reportado por</b>                        |
|-----------------|-------------------------------|---------------------------------------------------|
|                 |                               | <b>(Anu, Kumar, Kumar, &amp; Singh, 2021) (%)</b> |
| Celulosa        | 32,79                         | 32 – 45                                           |
| Hemicelulosa    | 21,19                         | 20 – 32                                           |

En base seca los porcentajes de celulosa y hemicelulosa pueden variar dependiendo de factores como condiciones climáticas, ubicación geográfica y la biomasa que se esté manejando (Barrera, 2020). Para el bagazo de caña de azúcar los porcentajes de celulosa y hemicelulosa obtenidos fueron de 32,79 y 21,19%, respectivamente, estos valores se encuentran dentro de los rangos reportados en la literatura como se observa en la Tabla 13.

**Tabla 14.** *Valores de celulosa y hemicelulosa para la cascarilla de café*

| <b>Polímero</b> | <b>Valor experimental (%)</b> | <b>Valor reportado por</b>                |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------------------|
|                 |                               | <b>(Bekalo &amp; Reinhardt, 2009) (%)</b> |
| Celulosa        | 25,22                         | 19 -26                                    |
| Hemicelulosa    | 16,49                         | 24 – 45                                   |

En la Tabla 14 se pueden observar los porcentajes de celulosa y hemicelulosa obtenidos para la cascarilla de café, siendo de 25,22 y 16,49%, respectivamente. Según la literatura, el valor de la celulosa se encuentra dentro del rango reportado (19-26%), por otro lado, el porcentaje obtenido para la hemicelulosa se encuentra por debajo del rango reportado (24-45%).

Sin embargo, cabe resaltar que las concentraciones de los azúcares reductores (glucosa, xilosa, arabinosa y celobiosa), se reducen al someterse a concentraciones altas de ácidos, ya que al continuar la hidrólisis, se pueden formar compuestos como el HMF (hidroximetilfurfural) y el

furfural, estos compuestos tienen alta incidencia en el porcentaje de azúcares y también son inhibidores del crecimiento microbiano de los procesos fermentativos reduciendo el rendimiento de obtención del bioetanol (Aimarett, y otros, 2013).

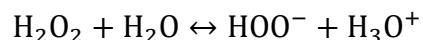
#### **4.2. Evaluación de la etapa de pretratamiento con peróxido de hidrógeno mediante un diseño de experimentos $2^3$**

Para evaluar la etapa de pretratamiento con peróxido de hidrógeno sobre el bagazo de caña de azúcar y la cascarilla de café, se implementó un diseño experimental  $2^3$  con triplicado en el punto central (ensayos 2, 5 y 11), donde se evaluaron las variables de tiempo, temperatura y concentración de peróxido, para conocer la de mayor significancia en el pretratamiento.

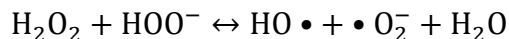
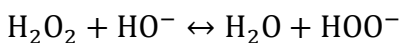
El pretratamiento oxidativo con peróxido de hidrógeno promueve la deslignificación de las biomásas mediante la oxidación y solubilización de la lignina, sin dañar la celulosa. El rendimiento del pretratamiento para cada ensayo se determinó calculando el porcentaje de pérdida de masa por parte de las biomásas después del pretratamiento, empleando la ecuación mostrada en la sección 3.6, considerando la remoción de la lignina en la reacción de oxidación.

(Da silva, 2015) describió la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno para comprender los mecanismos implicados en la degradación de la lignina y la posterior solubilización, las reacciones se muestran a continuación:

Al reaccionar con el agua, el peróxido tiene la siguiente reacción:



El peróxido como agente deslignificante para la biomasa lignocelulósica necesita la ayuda de un medio alcalino (NaOH), ya que este agente se comporta mejor en un rango de pH de 11,5-11,6.



Los radicales hidroxilos ( $\text{HO} \bullet$ ) y superóxido ( $\bullet \text{O}_2^-$ ) resultantes de la descomposición del peróxido de hidrógeno, son responsables de la oxidación de la lignina y la disolución de las hemicelulosas.

#### 4.2.1. Diseño de experimentos 2<sup>3</sup> sobre el bagazo de caña de azúcar

En la Tabla 15 se consignan los resultados del diseño de experimentos sobre el bagazo de caña de azúcar, donde se muestran los rendimientos obtenidos para cada ensayo.

**Tabla 15.** *Diseño de experimentos 2<sup>3</sup> con peróxido de hidrógeno sobre el bagazo de caña de azúcar*

| Ensayo | Tiempo (min) | Temperatura (°C) | Concentración (%) | Rendimiento del pretratamiento (%) |
|--------|--------------|------------------|-------------------|------------------------------------|
| 1      | 80           | 65               | 3                 | 27                                 |
| 2*     | 60           | 45               | 9                 | 26                                 |
| 3      | 40           | 65               | 15                | 30                                 |
| 4      | 80           | 25               | 15                | 25                                 |
| 5*     | 60           | 45               | 9                 | 26                                 |
| 6      | 40           | 25               | 15                | 24                                 |
| 7      | 40           | 65               | 3                 | 26                                 |
| 8      | 80           | 25               | 3                 | 16                                 |
| 9      | 80           | 65               | 15                | 34                                 |
| 10     | 40           | 25               | 3                 | 15                                 |
| 11*    | 60           | 45               | 9                 | 26                                 |

Nota: \* Triplicado del diseño experimental. Fuente: Autor.

De acuerdo a los resultados obtenidos para el bagazo de caña de azúcar, se obtuvo mejor remoción de lignina en el ensayo 9 con un rendimiento del 34% con condiciones de reacción de 80 min, 60°C y concentración de reactivo del 15%, seguido por el ensayo 3 con rendimiento del 30% y condiciones de reacción de 40 min, 60°C y concentración de reactivo del 15%. Por otro lado, donde se obtuvo menor remoción de lignina fue en el ensayo 10 con un rendimiento del 15% con condiciones de reacción de 40 min, 25°C y concentración de reactivo del 3%, seguido por el ensayo 8 con rendimiento del 16% y condiciones de reacción de 80 min, 25°C y concentración de reactivo del 3%.

En el pretratamiento del bagazo de caña de azúcar se puede evidenciar que los ensayos que obtuvieron mayores rendimientos fueron los que presentaban las condiciones de temperatura y concentración de reactivo en el nivel +1 equivalente a 60°C y 15%, respectivamente, mientras que los ensayos que tuvieron los rendimientos más bajos fueron los que presentaron estas condiciones en el nivel -1 equivalente a 25°C y 3%.

Estos resultados indican que la temperatura y la concentración de reacción son variables de significancia en el diseño experimental con peróxido de hidrógeno.

#### ***4.2.2. Diseño de experimentos 2<sup>3</sup> sobre la cascarilla de café***

En la Tabla 16 se consignan los resultados del diseño de experimentos sobre la cascarilla de café, donde se muestran rendimientos obtenidos para cada ensayo.

**Tabla 16.** *Diseño de experimentos 2<sup>3</sup> con peróxido de hidrógeno sobre la cascarilla de café*

| Ensayo | Tiempo (min) | Temperatura (°C) | Concentración (%) | Rendimiento del pretratamiento (%) |
|--------|--------------|------------------|-------------------|------------------------------------|
| 1      | 80           | 65               | 3                 | 24                                 |
| 2*     | 60           | 45               | 9                 | 23                                 |
| 3      | 40           | 65               | 15                | 21                                 |
| 4      | 80           | 25               | 15                | 16                                 |
| 5*     | 60           | 45               | 9                 | 15                                 |
| 6      | 40           | 25               | 15                | 15                                 |
| 7      | 40           | 65               | 3                 | 19                                 |
| 8      | 80           | 25               | 3                 | 16                                 |
| 9      | 80           | 65               | 15                | 27                                 |
| 10     | 40           | 25               | 3                 | 14                                 |
| 11*    | 60           | 45               | 9                 | 18                                 |

Nota: \* Triplicado del diseño experimental. Fuente: Autor.

Se observa en la Tabla 16, que, para la cascarilla de café, se obtuvo mayor remoción de lignina en el ensayo 9 con un rendimiento del 27%, seguido del ensayo 1 con rendimiento del 24% y condiciones de reacción de 80 min, 65°C y concentración de reactivo del 3%. Mientras que la menor remoción de lignina lo tuvo el ensayo 10 con un rendimiento del 14%, seguido del ensayo 6 con rendimiento del 15% y condiciones de reacción de 40 min, 25°C y concentración de reactivo del 15%.

En el pretratamiento de la cascarilla de café, los ensayos que tuvieron la temperatura en el nivel -1 equivalente a 25°C presentaron los rendimientos más bajos, sin importar las variaciones

de tiempo y concentración de reactivo entre los niveles -1 y +1 equivalentes a 40-80 min y 3-15%, respectivamente. Indicando que la temperatura podría ser la variable con mayor significancia.

#### 4.3. Hidrólisis enzimática

En la Tabla 17 se muestran los resultados de la hidrólisis enzimática realizada sobre el bagazo de caña y la cascarilla de café sin tratar y pretratado, con las concentraciones de glucosa en g/L obtenidas para cada ensayo. Para la determinación de la concentración de la glucosa se empleó la curva de calibrado mostrada en la Figura 12. El rendimiento de la hidrólisis para cada ensayo se determinó calculando el porcentaje de pérdida de masa por parte de las biomásas después de la hidrólisis enzimática, empleando la ecuación mostrada en la sección 3.7, considerando la hidrólisis de la biomasa mediante la fractura en monómeros de la celulosa.

**Tabla 17.** Rendimientos de la hidrólisis enzimática sobre el bagazo de caña de azúcar y la cascarilla de café junto con la concentración de glucosa obtenida

| Ensayo | Bagazo de caña de azúcar         |                                | Cascarilla de café               |                                |
|--------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
|        | Rendimiento de la hidrólisis (%) | Concentración de glucosa (g/L) | Rendimiento de la hidrólisis (%) | Concentración de glucosa (g/L) |
| 1      | 11                               | 0,193                          | 27                               | 0,511                          |
| 2*     | 13                               | 0,217                          | 22                               | 0,492                          |
| 3      | 14                               | 0,295                          | 26                               | 0,503                          |
| 4      | 12                               | 0,109                          | 22                               | 0,217                          |
| 5*     | 13                               | 0,218                          | 23                               | 0,368                          |
| 6      | 12                               | 0,158                          | 23                               | 0,409                          |
| 7      | 11                               | 0,149                          | 23                               | 0,456                          |
| 8      | 11                               | 0,125                          | 23                               | 0,351                          |

|               |    |       |    |       |
|---------------|----|-------|----|-------|
| 9             | 18 | 0,428 | 24 | 0,572 |
| 10            | 12 | 0,117 | 22 | 0,284 |
| 11*           | 13 | 0,221 | 21 | 0,261 |
| Sin<br>tratar | 3  | -     | 7  | -     |

Nota: \* Triplicado del diseño experimental. Fuente: Autor.

En la hidrólisis enzimática para el bagazo de caña de azúcar, se obtuvo mayor concentración de glucosa en el ensayo 9 siendo de 0,428 g/L y un rendimiento de biomasa hidrolizada del 18%, seguido del ensayo 3 con una concentración de 0,295 g/L y rendimiento del 14%. Por otro lado, la concentración más baja se obtuvo en el ensayo 4 con un valor de 0,109 g/L y rendimiento del 12%, seguido del ensayo 10 con una concentración de glucosa de 0,117 g/L y rendimiento del 12%.

Por su parte, en la hidrólisis de la cascarilla de café, el ensayo con mayor concentración de glucosa fue el 9 con un valor de 0,572 g/L y rendimiento de biomasa hidrolizada del 24%, seguido del ensayo 1 y 3 con concentraciones de 0,511 y 0,503 g/L, respectivamente, y rendimientos del 27 y 26%, respectivamente. Por otro lado, la menor concentración de glucosa se obtuvo en el ensayo 4 con un valor de 0,217 g/L y rendimiento de hidrólisis del 22%, seguido por el ensayo 11 con un valor de 0,261 y rendimiento del 21%.

Al observar los rendimientos obtenidos del pretratamiento oxidativo sobre el bagazo de caña de azúcar y la cascarilla de café mostrados en las Tablas 15 y 16, y los rendimientos de hidrólisis y concentraciones de glucosa para ambas biomásas consignados en la Tabla 17, se evidencia que los ensayos que tuvieron mayores concentraciones de glucosa fueron los que presentaron mayores rendimientos en la etapa de pretratamiento. También cabe resaltar, que tanto

la cascarilla de café como el bagazo de caña de azúcar sin pretratamiento, presentaron rendimientos de hidrólisis muy inferiores (7 y 3%, respectivamente) en comparación a las biomásas pretratadas.

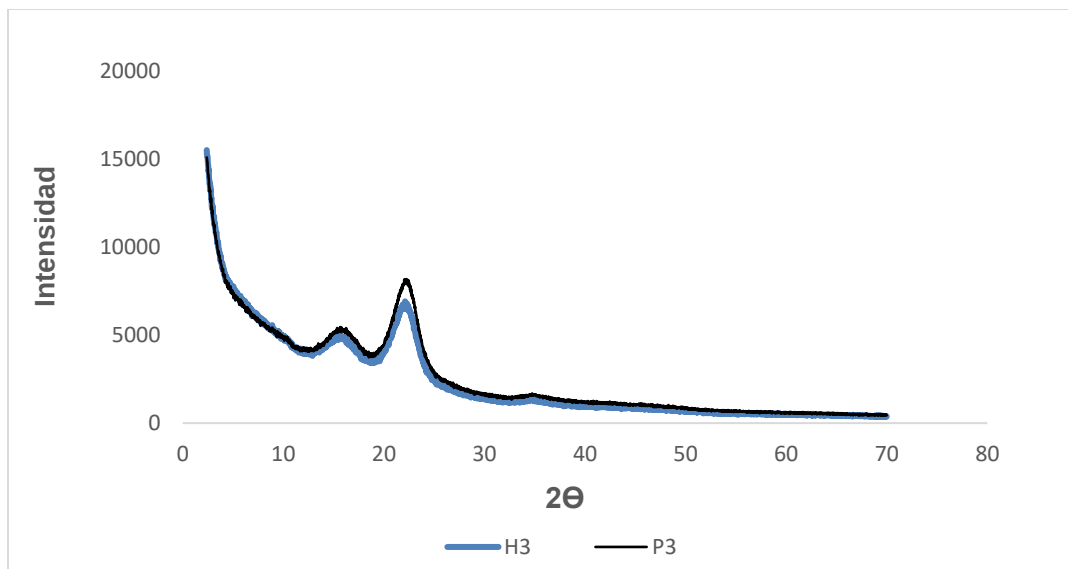
En la Tabla 17 se puede observar que se obtuvieron mayores rendimientos de hidrólisis y concentraciones más altas de glucosa con la cascarilla de café a pesar de que en la etapa de pretratamiento el bagazo de caña de azúcar presentó mejores rendimientos de remoción de lignina, esto puede ser por factores como el índice de cristalinidad de la celulosa, donde la cascarilla de café pudo presentar mayor reducción del mismo en la etapa de pretratamiento a diferencia del bagazo de caña, esto se evidenciará mediante la caracterización por Difracción de Rayos X (DRX).

#### **4.4. Caracterización por técnicas instrumentales**

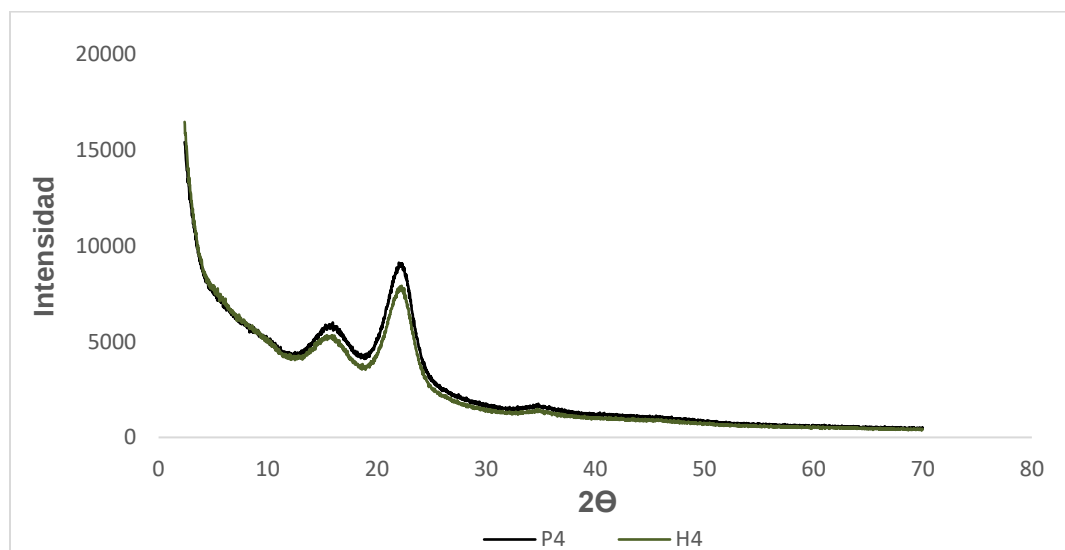
##### ***4.4.1. Caracterización por difracción de rayos X (DRX)***

La cristalinidad de la celulosa afecta el rendimiento de la hidrólisis enzimática por su estructura altamente ordenada, por esta razón es necesario realizar pretratamientos sobre el material lignocelulósico con el fin de aumentar la fracción de celulosa amorfa (Ramadoss & Murthukumar, 2015). Mediante la caracterización de Difracción de Rayos X se obtuvieron los difractogramas de los picos cristalinos y amorfos de la celulosa, para las biomásas pretratadas e hidrolizadas. El registro de datos para la caracterización por DRX se realizó en el rango  $2\theta$  de  $2^\circ$  a  $70^\circ$ , a un tiempo por paso de 0,6 segundos, siendo cada paso de  $0,02035^\circ$  ( $2\theta$ ). En los difractogramas del bagazo de caña de azúcar y la cascarilla de café, se observan las señales para la celulosa cristalina en el rango  $2\theta$  en  $22,6^\circ$  y para la celulosa amorfa en el rango  $2\theta$  en  $19^\circ$ . En la Figura 15 se consignan los resultados de DRX para los ensayos 3 y 4, donde se muestran los difractogramas del bagazo de caña de azúcar pretratado con peróxido de hidrógeno e hidrolizado.

**Figura 15.** Difractogramas del bagazo de caña de azúcar pretratado e hidrolizado, ensayo 3 (a), ensayo 4 (b)



(a)



(b)

En la Figura 15-a se muestran los difractogramas del ensayo 3 con condiciones de pretratamiento de 40 min, 65°C y concentración de reactivo del 15%, en el que se obtuvo un rendimiento de remoción de lignina del 30% y un rendimiento de hidrólisis enzimática del 14%, el difractograma presenta dos bandas, la primera banda en color negro corresponde a la biomasa

pretratada con un índice de cristalinidad de la celulosa del 31% y la segunda en color azul perteneciente a la biomasa hidrolizada con índice de cristalinidad del 29%.

La Figura 15-b muestra los difractogramas para el ensayo 4 con condiciones de pretratamiento de 80 min, 25°C y concentración de reactivo del 15%, en el que se obtuvo un rendimiento de remoción de lignina del 25% y un rendimiento de hidrólisis enzimática del 12%, el difractograma presenta dos bandas, siendo la primera de la biomasa pretratada en color negro y con un índice de cristalinidad de la celulosa del 33% y la segunda en color verde correspondiente a la biomasa hidrolizada y con índice de cristalinidad de 31%.

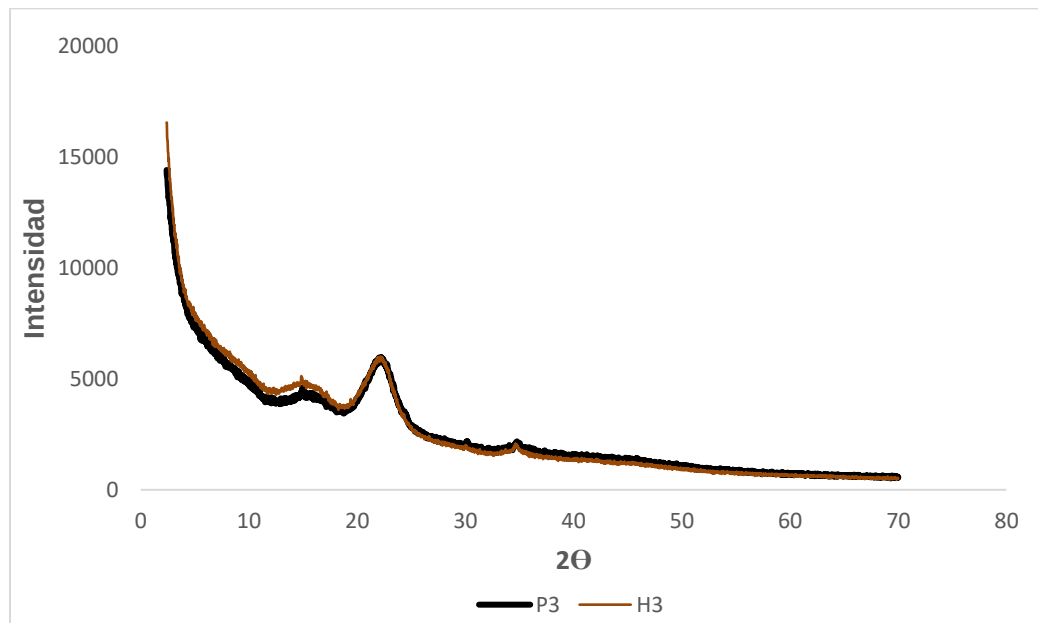
En ambos gráficos se puede observar una reducción de intensidad para la señal de celulosa amorfa y cristalina por parte de la banda correspondiente a la biomasa hidrolizada en comparación a las obtenidas para el material pretratado, indicando la afección que tiene la hidrólisis en la celulosa en especial sobre la sección cristalina de esta.

El índice de cristalinidad de la celulosa para el bagazo de caña de azúcar en estado natural es reportado en la literatura entre el 49-59% (Guimaraes, Frollini, Silva, Wypych, & Satyanarayana, 2009). Según los resultados obtenidos, se observa una reducción del índice de cristalinidad de la celulosa por parte de las biomاسas pretratadas e hidrolizadas, esto se debe principalmente a que el pretratamiento oxidativo con peróxido de hidrógeno afecta la parte cristalina altamente ordenada de la celulosa, rompiendo los enlaces intermoleculares presentes entre las cadenas, reduciendo su índice cristalino. Este efecto aumenta por la catálisis enzimática de la hidrólisis, razón por la cual el porcentaje para la biomasa hidrolizada es menor a la pretratada.

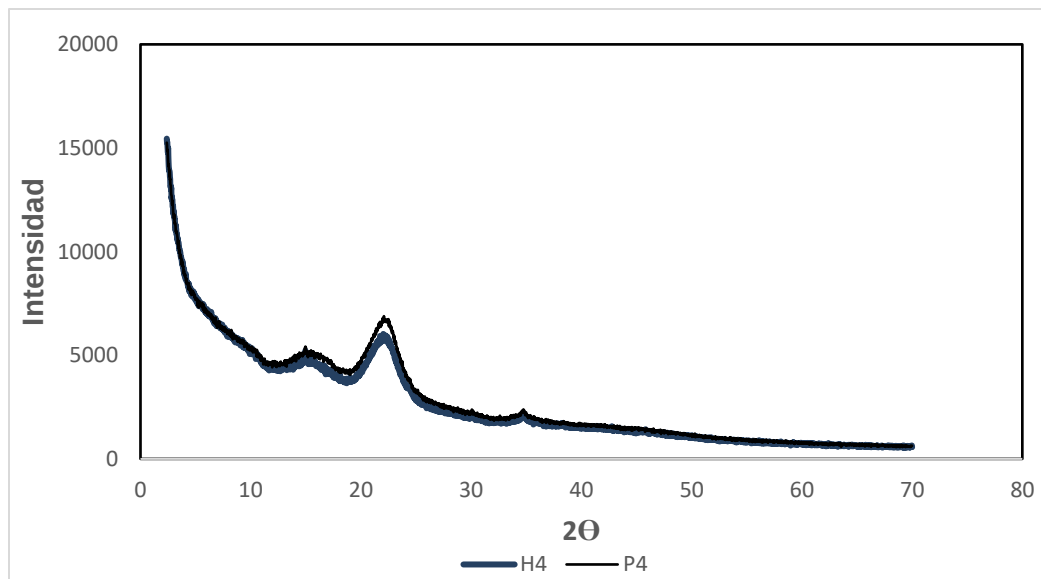
La reducción del índice de cristalinidad depende de la eficacia en el pretratamiento oxidativo sobre el bagazo de caña de azúcar, por esta razón, el ensayo 3 presenta una mayor reducción del índice de cristalinidad de la celulosa en comparación al ensayo 4.

A continuación, se muestran los resultados de DRX para los ensayos 3 y 4 de la cascarilla de café, donde se muestran los difractogramas de las biomazas pretratadas con peróxido de hidrógeno e hidrolizadas.

**Figura 16.** Difractograma de la cascarilla de café pretratado e hidrolizado, ensayo 3 (a), ensayo 4 (b)



(a)



(b)

En la Figura 16-a se muestran los difractogramas del ensayo 3 el cual tuvo un rendimiento en la etapa de pretratamiento del 21% y un rendimiento de hidrólisis enzimática del 26%, el difractograma presenta dos bandas, la primera banda en color negro corresponde a la biomasa pretratada con un índice de cristalinidad de la celulosa del 21% y la segunda en color azul perteneciente a la biomasa hidrolizada con índice de cristalinidad del 17%. Al observar las intensidades de ambas bandas se observa que no hubo una reducción notoria del pico cristalino ubicado en el rango  $2\theta$  en  $22,6^\circ$ , por parte de la biomasa hidrolizada.

La Figura 16-b muestra los difractogramas para el ensayo 4 el cual presenta un rendimiento de pretratamiento del 16% y un rendimiento de hidrólisis enzimática del 22%, el difractograma presenta dos bandas, siendo la primera de la biomasa pretratada en color negro y con un índice de cristalinidad de la celulosa del 25% y la segunda en color azul correspondiente a la biomasa hidrolizada con índice de cristalinidad del 17%.

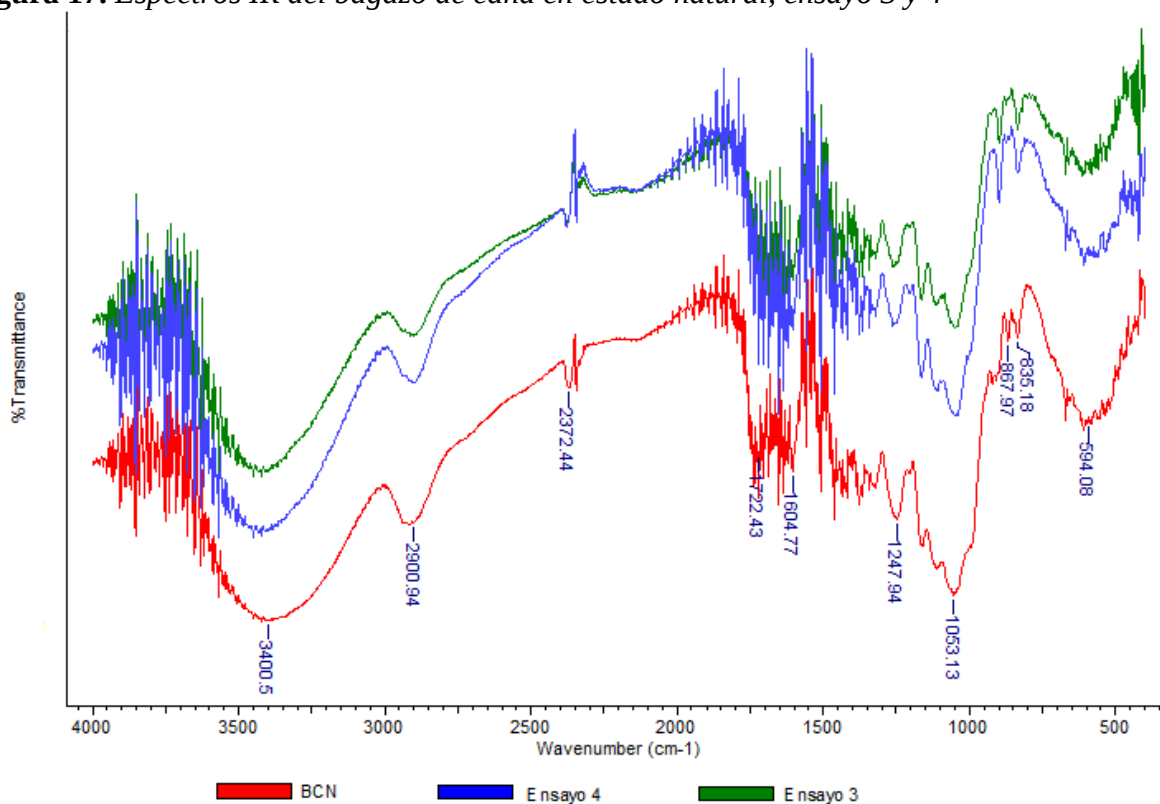
Para la cascarilla de café en estado natural, (Álvarez A. , 2016) reporta un valor de índice de cristalinidad del 39%. Según los resultados obtenidos, las biomásas pretratadas presentaron una reducción del índice de cristalinidad, siendo mayor en el ensayo 3 con un índice de cristalinidad de celulosa del 21% a diferencia del ensayo 4 cuyo valor fue del 25%. Sin embargo, los valores obtenidos para las biomásas hidrolizadas fueron de 17% para ambos ensayos, indicando que en el ensayo 4 la catálisis enzimática tuvo mayor efecto sobre la celulosa, ya que tuvo una reducción del índice cristalino del 8%, mientras que para el ensayo 4 fue del 4%.

Cabe resaltar que, tanto para el bagazo de caña de azúcar como para la cascarilla de café, el ensayo que presentó mayor reducción del índice de cristalinidad (ensayo 3), fue el que tuvo mejor rendimiento en la hidrólisis enzimática y por ende se obtuvo una mayor concentración de glucosa.

#### 4.4.2. Caracterización por espectroscopia infrarroja (IR)

Los espectros infrarrojos del bagazo de caña de azúcar y la cascarilla de café sin tratar (BCN y CCN, respectivamente) y los pretratados (ensayos 3 y 4) se muestran en las Figuras 17 y 18. Para ambas biomásas se observan la disminución de las bandas principales en los espectros de los ensayos 3 y 4 en comparación al espectro de las biomásas sin tratar, esto debido al impacto que tiene el pretratamiento sobre el material en estado natural.

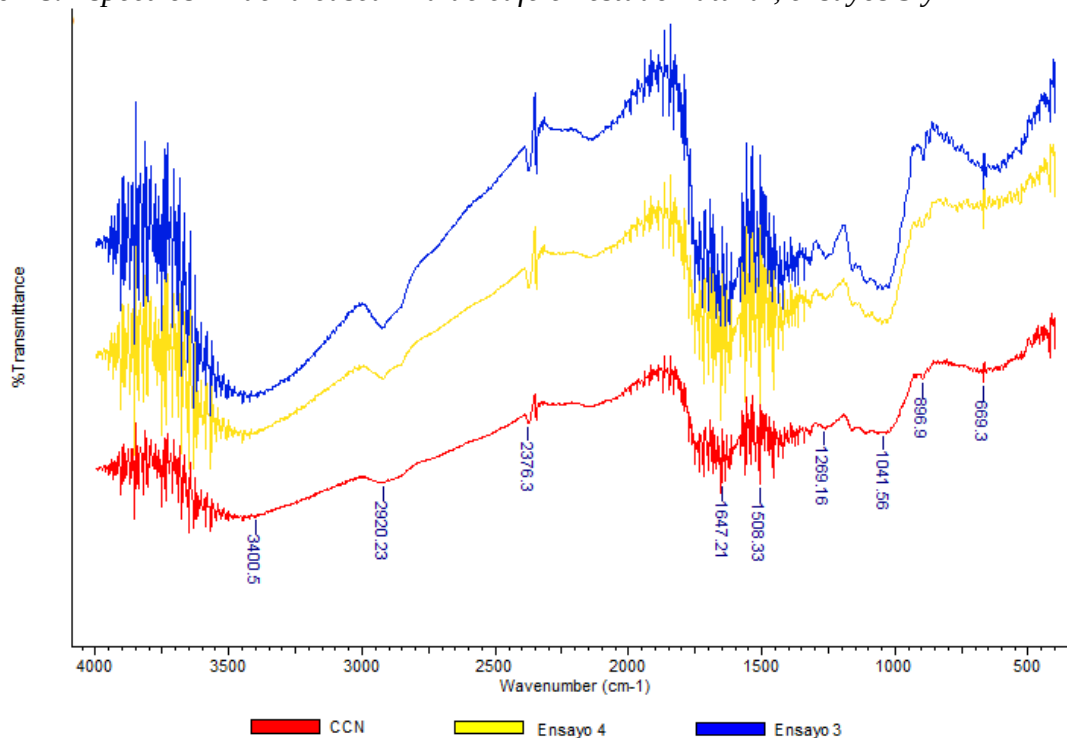
**Figura 17.** Espectros IR del bagazo de caña en estado natural, ensayo 3 y 4



El ensanchamiento de la banda en  $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$  se asoció con el estiramiento O-H de los enlaces de hidrógeno. El pico de absorción a  $2900\text{ cm}^{-1}$  se atribuyó a la vibración de estiramiento de  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  de la celulosa, hemicelulosa y lignina. La posición de la banda a  $1722\text{ cm}^{-1}$  pertenece a la vibración de estiramiento C=O en grupos acetil de hemicelulosas. El pico presenciado a  $1604\text{ cm}^{-1}$  cuya intensidad es mayor en las biomásas sin tratar se asocia a la presencia

de vibración esquelética aromática con estiramiento C=C de lignina. La banda de absorción a  $1247\text{ cm}^{-1}$  pertenece a la vibración de estiramiento C=O en el xilano y éster de la lignina, cuya intensidad se ve disminuida en los espectros de las biomásas pretratadas. La banda prominente a  $1053\text{ cm}^{-1}$  se asocia a la vibración de estiramiento C-O en celulosa, hemicelulosa y lignina o estiramiento C-O-C en celulosa y hemicelulosa. Una banda que se hace más visible en los ensayos 3 y 4 a  $867\text{ cm}^{-1}$  representa el espectro de celulosa correspondiente al enlace glucosídico, entre las unidades de azúcar en la hemicelulosa y la celulosa (Ramadoss & Murthukumar, 2015) (Pereira, Maehara, Machado, & Farinas, 2016).

**Figura 18.** Espectros IR de la cascarilla de café en estado natural, ensayos 3 y 4



El ensanchamiento de la banda en  $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$  se asoció con el estiramiento O-H de los enlaces de hidrógeno. El pico de absorción a  $2920\text{ cm}^{-1}$  se atribuyó a la vibración de estiramiento de  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  de la celulosa, hemicelulosa y lignina. El pico presenciado a  $1647\text{ cm}^{-1}$  cuya intensidad es mayor en las biomásas sin tratar se asocia a la presencia de vibración esquelética aromática con estiramiento C=C de lignina. La banda de absorción a  $1269\text{ cm}^{-1}$

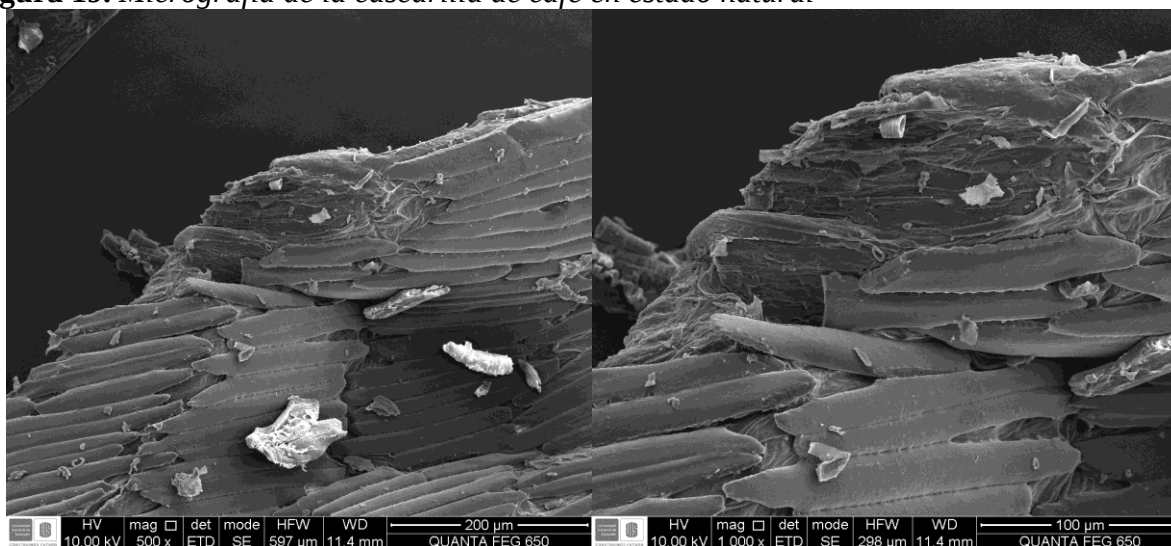
pertenece a la vibración de estiramiento  $C=O$  en el xilano y éster de la lignina, cuya intensidad se ve disminuida en los espectros de las biomásas pretratadas. La banda prominente a  $1041\text{ cm}^{-1}$  se asocia a la vibración de estiramiento  $C-O$  en celulosa, hemicelulosa y lignina o estiramiento  $C-O-C$  en celulosa y hemicelulosa. Una banda que se hace más visible en el ensayo 4 a  $896\text{ cm}^{-1}$  representa el espectro de celulosa correspondiente al enlace glucosídico, entre las unidades de azúcar en la hemicelulosa y la celulosa (Ramadoss & Murthukumar, 2015) (Pereira, Maehara, Machado, & Farinas, 2016).

#### 4.4.3. Caracterización por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

Mediante la microscopia electrónica de barrido se realizó el análisis morfológico de la cascarilla de café, con el fin de evaluar la superficie y morfología de la biomasa en estado natural, después del pretratamiento y después de la hidrólisis enzimática.

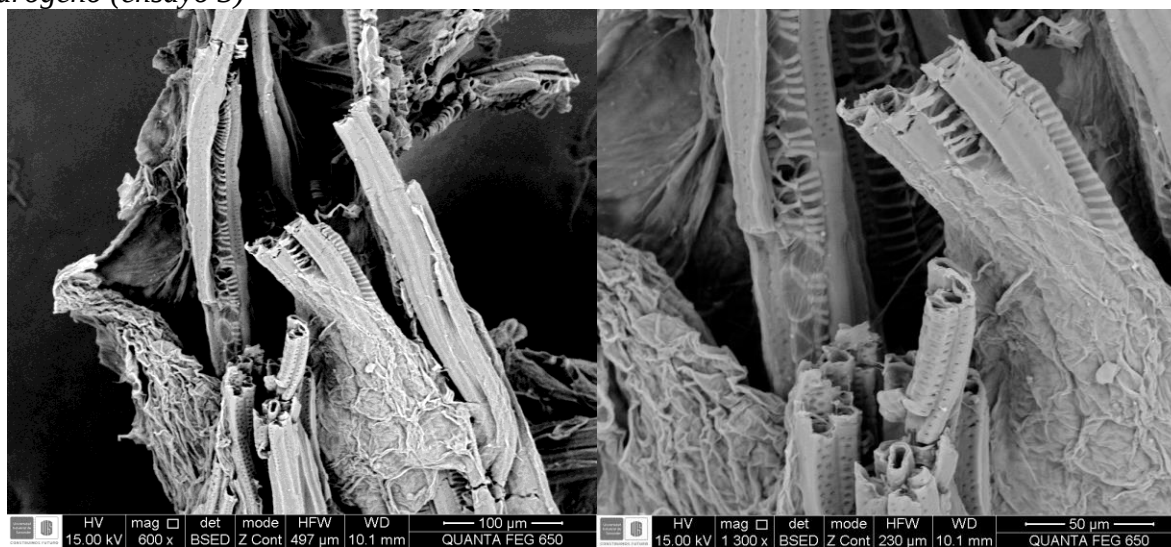
En las figuras 19, 20, 21 y 22 se muestran las micrografías de la cascarilla de café en estado natural, posterior al pretratamiento (ensayo 3 y 4) y posterior a la hidrólisis enzimática (ensayo 3), respectivamente.

**Figura 19.** Micrografía de la cascarilla de café en estado natural



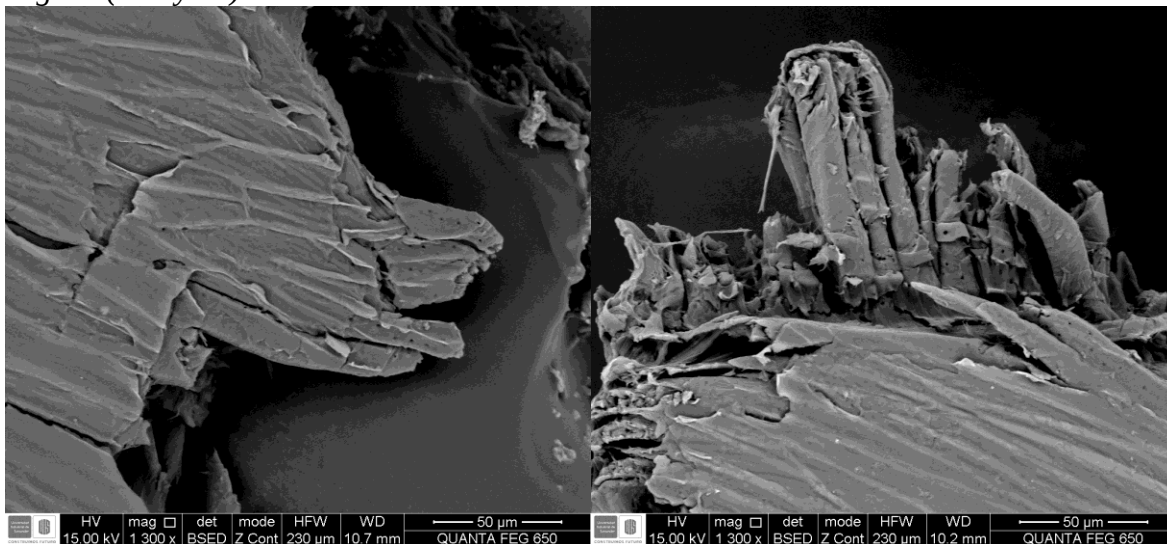
En la Figura 19 se observa la cascarilla de café en estado natural, la cual presenta una estructura compacta con fibras largas y ordenadas, una morfología consistente con pocos poros donde la lignina no permite la accesibilidad superficial para la hidrólisis.

**Figura 20.** Micrografía de la cascarilla de café posterior al pretratamiento con peróxido de hidrógeno (ensayo 3)



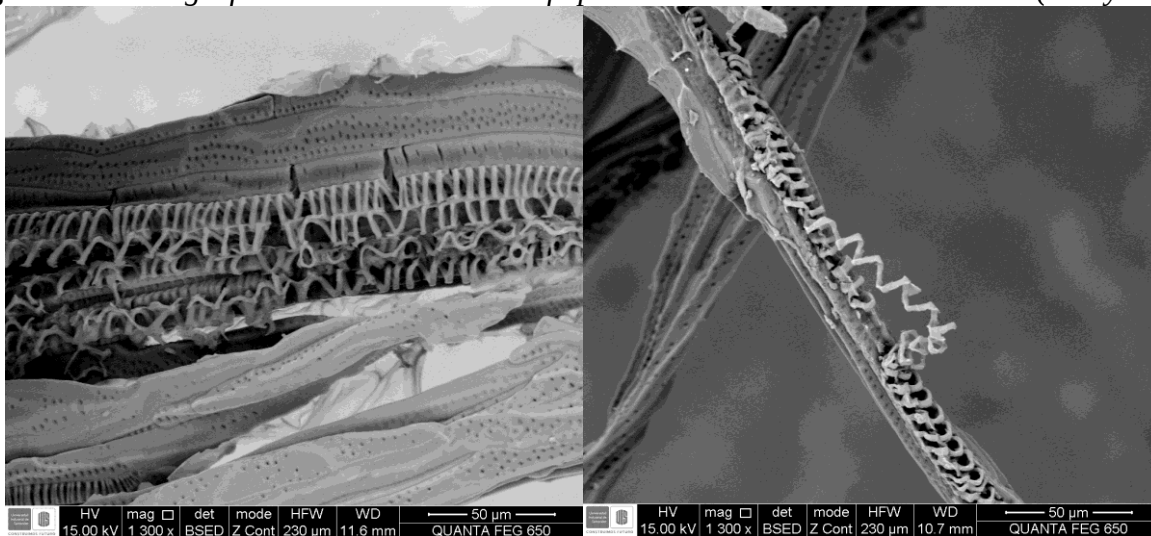
En la Figura 20 se muestra la biomasa del ensayo 3 del diseño de experimentos (condiciones de 40 min, 65°C y 15%), donde se observa una estructura menos rígida con una ruptura de la pared celular pronunciada y la presencia de poros por la pérdida de lignina debido al pretratamiento oxidativo. Se observa el rompimiento de la estructura compacta mostrada en la Figura 19 y la pérdida parcial de lignina y hemicelulosa, aumentando la accesibilidad hacia la celulosa por parte de las enzimas en la etapa de hidrólisis. También se observa fibras de celulosa por el rompimiento de la pared celular.

**Figura 21.** Micrografía de la cascarilla de café posterior al pretratamiento con peróxido de hidrógeno (ensayo 4)



La micrografía del ensayo 4 del diseño de experimentos (condiciones de 80 min, 25°C y 15%), muestra una afectación leve sobre la superficie de la cascarilla de café, donde se observa poca presencia de poros y poco rompimiento de la pared celular. Cabe resaltar que el rendimiento del pretratamiento y por ende la remoción de lignina es mayor en el ensayo 3 (21%) a diferencia del ensayo 4 cuyo porcentaje es del 16%.

**Figura 22.** Micrografía de la cascarilla de café posterior a la hidrólisis enzimática (ensayo 3)



En la Figura 22 se muestra la micrografía de la cascarilla de café hidrolizada donde se ve un material más fracturado con fibras visibles de celulosa y alta cantidad de poros por la deslignificación de la biomasa.

#### **4.5. Desarrollo de un prototipo de reactor**

La consolidación de la producción industrial de bioetanol de segunda generación se basa en la mejora de la economía del proceso, ya que este consta de una etapa adicional donde se tratan las biomasas para aumentar los rendimientos de obtención de azúcares en la hidrólisis enzimática. Es evidente que la optimización de los diseños de reactores permitirá superar las dificultades en el pretratamiento del material lignocelulósico.

Para desarrollar un reactor óptimo de pretratamientos fue necesario analizar los diversos factores que presentan influencia en esta etapa, mediante consultas bibliográficas y el desarrollo de los dos diseños de experimentos 2<sup>3</sup> analizados en esta investigación. Con ello se determinaron las características principales para la implementación de un reactor vertical de pretratamiento químico a escala de laboratorio, haciendo énfasis en el sistema de agitación para garantizar la homogeneización entre el reactivo y la biomasa, para poder llevar a cabo ensayos aumentando la carga de sólidos.

##### ***4.5.1. Determinación de las características principales de un reactor para pretratamientos químicos***

Para realizar el diseño del reactor se definieron las características más importantes del mismo, la cuáles fueron: tipo de reactor, forma, agitación y material de fabricación. En la Tabla

18, se consignan las bases que se manejaron para el diseño del reactor utilizando las condiciones de operación empleadas en el diseño experimental <sup>23</sup>.

**Tabla 18.** *Condiciones operacionales de la etapa de pretratamiento*

| <b>Condiciones</b>                   |                       |
|--------------------------------------|-----------------------|
| <b>Temperatura (°C)</b>              | 25-65                 |
| <b>Tiempo (min)</b>                  | 45-80                 |
| <b>Concentración de reactivo (%)</b> | 3-15                  |
| <b>Agitación (rpm)</b>               | 150                   |
| <b>Cantidad de biomasa (g)</b>       | 15                    |
| <b>Reactivo</b>                      | Peróxido de hidrógeno |
| <b>Tamaño de partícula (mm)</b>      | 0,5-1,5               |

Fuente: Autor

Para el diseño de experimentos se empleó agitación magnética, sin embargo, se observó que no era eficiente ya que no permitía la completa homogeneización entre el peróxido de hidrógeno y la biomasa.

**4.5.1.1. Tipo de reactor.** Debido a la naturaleza de la reacción y al modo de realizar los pretratamientos a escala de laboratorio, se recomienda utilizar un reactor por cargas debido a la sencillez del proceso.

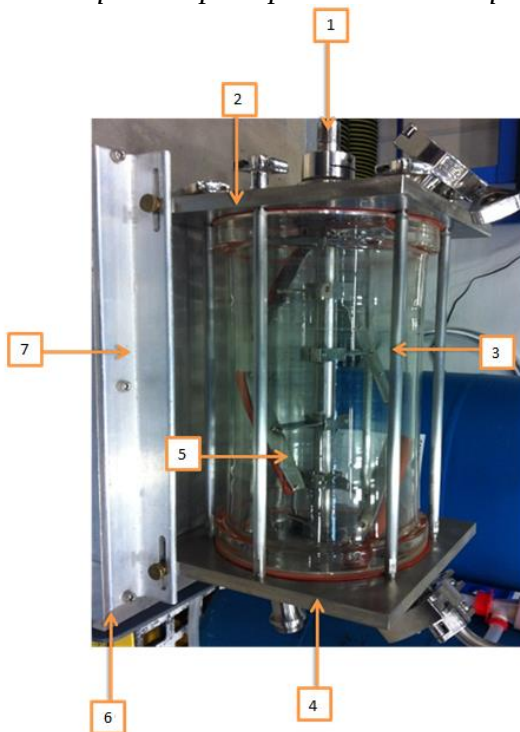
**4.5.1.2. Selección de la forma del reactor.** Debido a que en la etapa de pretratamientos se busca pretratar altas cantidades de biomasa sin que se vea afectado su rendimiento, se recomienda diseñar un reactor con una forma tal que permita el contacto adecuado entre el reactivo y el material

lignocelulósico. El bagazo de caña de azúcar y la cascarilla de café utilizado, presentan un rango considerable de tamaño de partícula, que, según el recipiente, no permite una adecuada homogeneización, ya que una parte de la biomasa tiende a depositarse en el fondo del recipiente y otra parte tiende a flotar en la superficie. Es por esta razón que se recomienda un reactor de forma cilíndrica de orientación vertical, con una agitación tal que provoque un flujo continuo de la mezcla de reacción.

En lo que se refiere a las dimensiones del reactor, la bibliografía recomienda una relación entre longitud y diámetro igual a 3 (Wallas, 1990).

En la Figura 23 se muestra el reactor químico en vidrio que permite la completa observación del proceso de pretratamiento que se lleva a cabo dentro.

**Figura 23.** *Reactor en vidrio enchaquetado para pretratamientos químicos*



En la Tabla 19 se encuentra la descripción de cada componente.

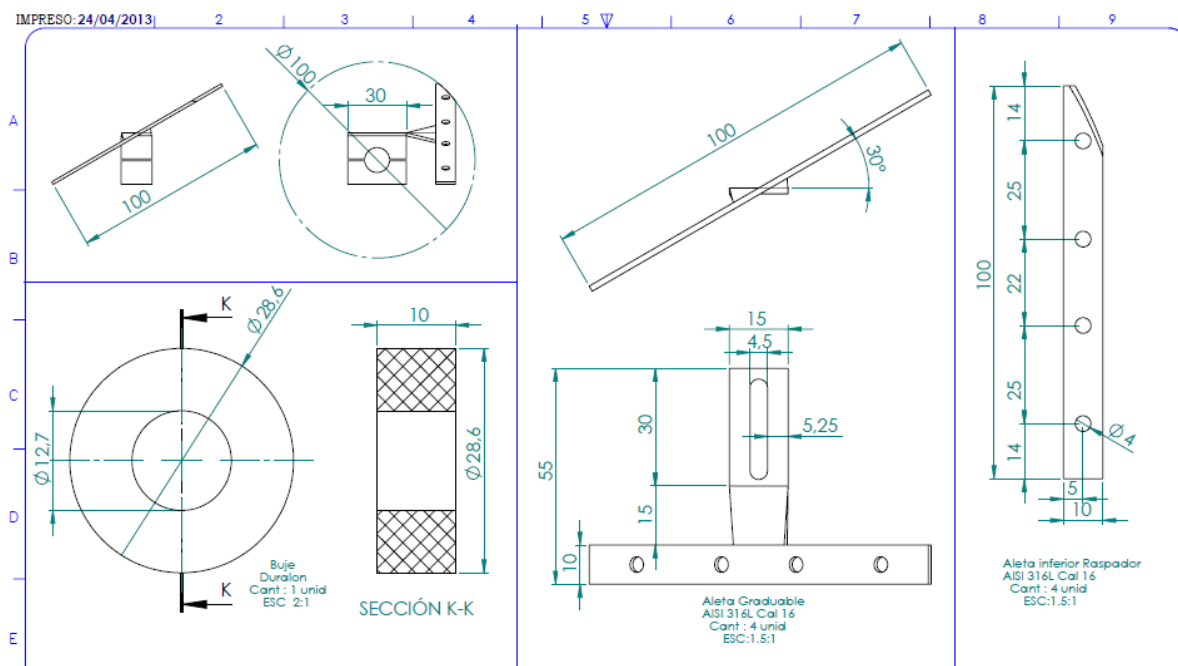
**Tabla 19.** *Descripción del reactor*

| Ubicación en el plano |                                           | Descripción       |
|-----------------------|-------------------------------------------|-------------------|
| 1                     |                                           | Eje central       |
| 2                     |                                           | Tapa frontal      |
| 3                     |                                           | Tirantes externos |
| 4                     |                                           | Tapa trasera      |
| 5                     |                                           | Impulsor          |
| 6                     | Lamina para soportar todo el reactor      |                   |
| 7                     | Lamina para fijación a la mesa de trabajo |                   |

**4.5.1.3. Selección del tipo de agitación.** La agitación es el procedimiento mediante el cual se puede lograr la mezcla homogénea entre el reactivo y la biomasa, además de mejorar el proceso de transferencia de calor y con ello el rendimiento del pretratamiento. Para determinar el diseño del sistema de agitación, se debe realizar un estudio de las características más importantes del medio. El medio manejado, es una mezcla de una solución de peróxido de hidrógeno con biomasa. Adicionalmente, se tiene que tener en cuenta que la agitación puede influir de manera significativa sobre el rendimiento y remoción de la lignina. Es por ello que se recomienda utilizar un agitador mecánico. Para optimizar el sistema de agitación se considerará el uso de varios internos o impulsores los cuales son un dispositivo rotatorio diseñado con el fin de empujar un fluido dentro de un tanque. Para elegir el mejor tipo de impulsor, es necesario establecer sus características principales. Se utilizará un impulsor tipo paleta, la cual tendrá una inclinación, formando un ángulo con la pared del reactor, que permita raspar la misma para mantener el sistema homogéneo durante el tiempo de pretratamiento. El plano del agitador se presenta en la Figura 24, las paletas llegan

hasta la pared del reactor, con una terminación de vitón o silicona, serán aproximadamente cuatro paletas.

**Figura 24.** Diseño del impulsor y aleta graduable

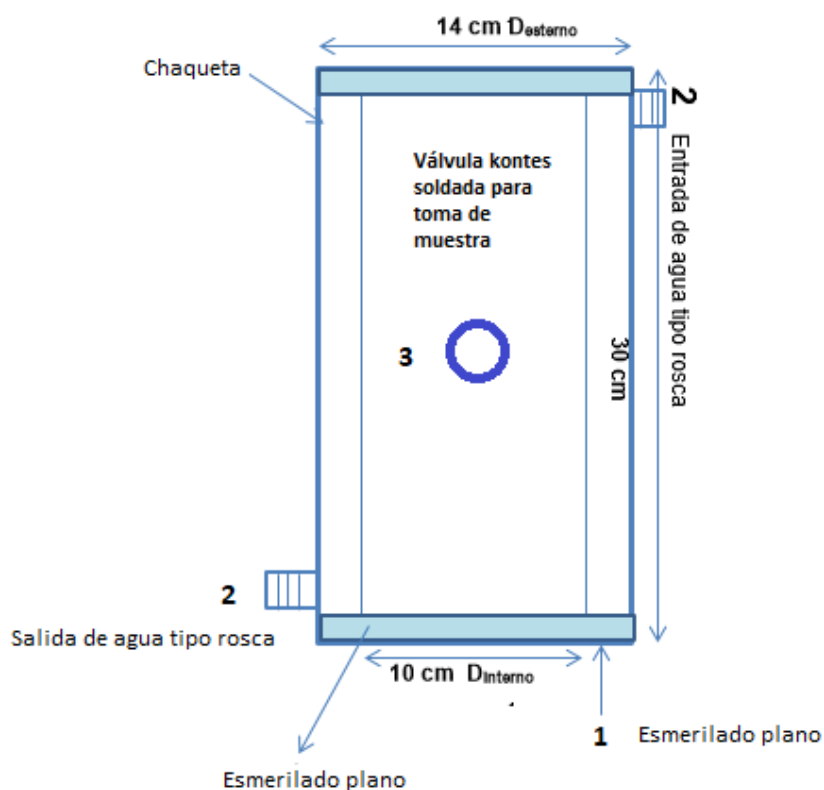


**4.5.1.4. Selección del material de construcción.** Debido a la naturaleza oxidante del peróxido de hidrógeno se recomienda manejar temperaturas bajas para reducir la inestabilidad del reactivo, por ello se eligió el vidrio para poder ver el proceso y analizar si se llevaba a cabo correctamente el pretratamiento. Sin embargo, cabe resaltar que, en las condiciones manejadas en esta investigación, no se observaron corrosión o inestabilidad por parte del reactivo.

A continuación, se presenta la Tabla 20 que resume las características principales que tendrá el reactor que realizará el proceso de pretratamiento químico a escala de laboratorio con la Figura 25 explicando las características del reactor de vidrio.

**Tabla 20.** *Resumen de las características del reactor*

| Características          | Elección                                                                                                               |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tipo de reactor          | Reactor por cargas batch                                                                                               |
| Forma del reactor        | Cilíndrico                                                                                                             |
| Orientación              | Vertical                                                                                                               |
| Relación L/D             | 3                                                                                                                      |
| Tipo de agitación        | Mecánica                                                                                                               |
| Impulsor                 | Tipo limpiador inclinado formando un ángulo de 30° con el eje del impulsor llegando hasta la pared interna del reactor |
| Diámetro del impulsor    | Diámetro del impulsor $D_i/D_r=0,7$ con goma de silicona o vitón al final para limpiar la pared del limpiador          |
| Velocidad del impulsor   | 150 rpm                                                                                                                |
| Material de construcción | Vidrio                                                                                                                 |

**Figura 25.** *Reactor de vidrio enchaquetado para pretratamiento químico*

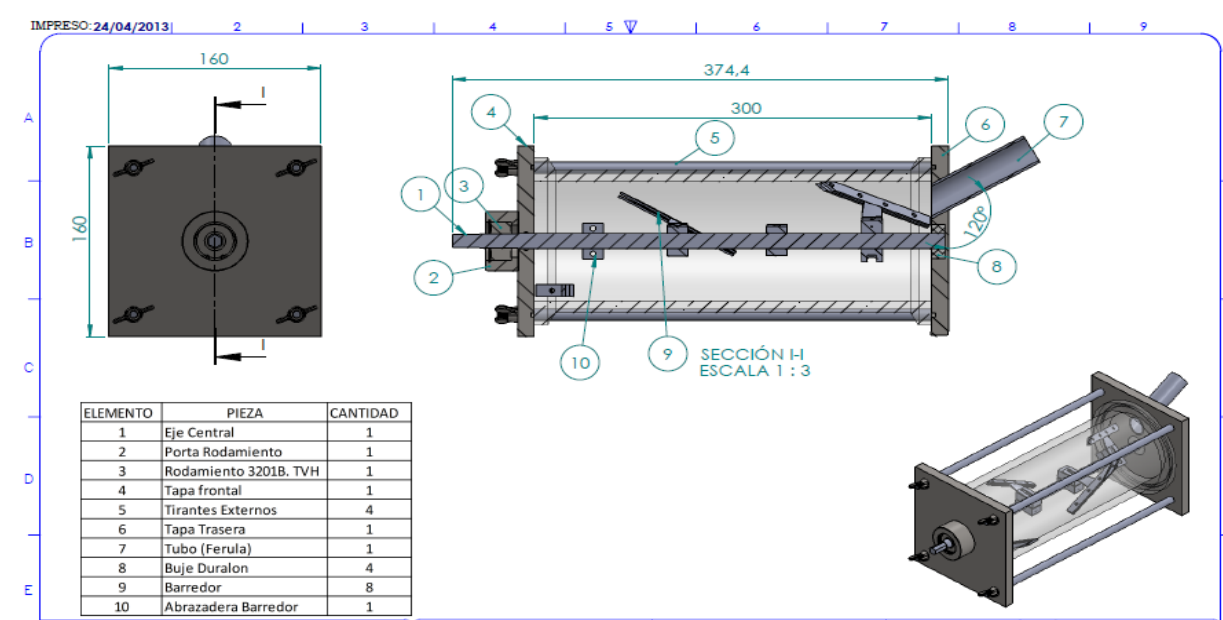
Las especificaciones del reactor de vidrio vertical se encuentran registradas en la Tabla 21.

Tabla 21. Especificaciones del reactor de vidrio enchaquetado para pretratamiento químico

| Características                                | Valor                                                                                                       |
|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Relación Longitud-Diámetro (L/D)               | 3                                                                                                           |
| Longitud (cm)                                  | 30                                                                                                          |
| Diámetro interno ( $D_{\text{interno}}$ ) (cm) | 10                                                                                                          |
| Diámetro externo ( $D_{\text{externo}}$ ) (cm) | 14                                                                                                          |
| Material de construcción                       | Vidrio                                                                                                      |
| 1                                              | Esmerilado plano                                                                                            |
| 2                                              | Entrada y salida de agua de rosca GL 18                                                                     |
| 3                                              | Válvula kontes soldada que llegue al interior del reactor y permita tomar muestras en el interior del mismo |

La Figura 26 muestra el plano del reactor químico con tapas y agitador.

Figura 26. Ensamble general del reactor



## 5. Conclusiones

Se determinaron los porcentajes de cenizas del bagazo de caña de azúcar (1,58%) y la cascarilla de café (3,16%), el valor obtenido para el bagazo de caña se encuentra dentro del rango reportado en la literatura que oscila entre 1-9%, por su parte, el valor de la cascarilla de café se encuentra por debajo al reportado en la literatura cuyo rango oscila entre 5,4-6,2%. Sin embargo, ambas biomاسas presentaron porcentajes de cenizas inferiores a 10%, lo que las hace viables para la producción de biocombustible.

Se logró la caracterización estructural de las biomاسas lignocelulósicas, donde los porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina para el bagazo de caña de azúcar (32,79, 21,19 y 28,02%, respectivamente), se encuentran dentro los rangos reportados en la literatura (32-45, 20-32 y 17-32%, respectivamente). Por su parte, los valores de celulosa y hemicelulosa para la cascarilla de café (25,22 y 16,49%, respectivamente) se encuentran dentro de los rangos reportados en la literatura (19-26 y 24-45%, respectivamente), sin embargo, el porcentaje de lignina obtenido (21,77%) se encuentra por debajo al reportado (23,7%).

Se evaluó el pretratamiento con peróxido de hidrógeno en el cual se obtuvieron mejores rendimientos de remoción de lignina en el bagazo de caña de azúcar, para ambas biomاسas el ensayo que presentó mejor rendimiento fue el ensayo 9 (80 min, 65°C y 15%) con rendimiento del 34% para el bagazo de caña y de 27% para la cascarilla de café. Mientras que la menor remoción de lignina en ambas biomاسas se obtuvo en el ensayo 10 (40 min, 25°C y 3%) con rendimiento del 15% para el bagazo de caña y de 14% para la cascarilla de café.

Se determinó la morfología de la cascarilla de café antes y después del pretratamiento, mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB), concluyendo que la cascarilla

de café tuvo un rompimiento de su estructura compacta y ordenada, donde se observó la formación de poros y rasgamiento por la deslignificación del material.

En el análisis de espectroscopia infrarroja, se observó que ambas biomاسas presentaban los grupos funcionales característicos de este tipo de material lignocelulósico, los espectros del material pretratado mostraron que las bandas características para lignina se vieron disminuidas por la influencia del pretratamiento.

Mediante el análisis de difracción de rayos x (DRX), se concluye que el índice de cristalinidad se vio afectado por el pretratamiento oxidativo, ya que para el bagazo de caña de azúcar y la cascarilla de café en estado natural se reportan valores de 49-59 y 39%, respectivamente, y los resultados obtenidos para el bagazo de caña fueron de 31% (ensayo 3) y 33% (ensayo 4), mientras que para la cascarilla de café fueron de 21% (ensayo 3) y 25% (ensayo 4).

Se obtuvieron mejores rendimientos y concentraciones de glucosa en la hidrólisis enzimática realizada sobre la cascarilla de café pretratada, donde el ensayo con mejores resultados fue el 9 con un valor de 0,572 g/L y rendimiento de biomasa hidrolizada del 24%, mientras que para el bagazo de caña de azúcar en el ensayo 9 se obtuvo un valor de 0,428 g/L y rendimiento del 14%. Se evidenció que los ensayos que tuvieron mayores rendimientos de remoción de lignina en la etapa de pretratamiento fueron los que presentaron mayores concentraciones de glucosa en la hidrólisis enzimática. También se demostró que las biomاسas al no ser pretratadas, presentan bajos rendimientos en la hidrólisis enzimática, donde para el bagazo de caña de azúcar y para la cascarilla de café sin tratar, se obtuvieron rendimientos del 7 y 3%, respectivamente.

Se presentó el diseño de un prototipo de reactor vertical para pretratamientos químicos, evaluando sus características principales (forma, tipo de reactor, agitación y material de

fabricación), haciendo énfasis en el tipo de agitación para obtener una correcta homogeneización del sistema durante el pretratamiento.

### Referencias

- Aimaretti, N., Ybalo, C., Escorcía, M., Codevilla, A., Rojas, M., Plou, F., & Yori, J. (2013). *Obtención de bioetanol de segunda generación a partir de residuos agroindustriales*. Santa Fé.
- Aimaretti, N., Ybalo, C., Escorcía, M., & Codevilla, A. (2012). Revalorización de Descartes Agroindustriales para la Obtención de Bioetanol. *INVENIO*, 15(28), 141-157.
- Akhlisah, Z., Yunus, R., Abidin, Z., Lim, B., & Kania, D. (2021). Pretreatment methods for an effective conversion of oil palm biomass into sugars and high-value chemicals. *Biomass and Bioenergy*, 144, 105901. doi:10.1016/j.biombioe.2020.105901
- Akhtar, J., & Amin, N. (2012). A review on operating parameters for optimum liquid oil yield in biomass pyrolysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(7), 5101-5109. doi:10.1016/j.rser.2012.05.033
- Alayoubi, R., Mehmood, N., Husson, E., Kouzayha, A., Tabcheh, M., Chaveriat, L., . . . Gosselin, I. (2020). Low temperature ionic liquid pretreatment of lignocellulosic biomass to enhance bioethanol yield. *Renewable Energy*, 145, 1808-1816. doi:10.1016/j.renene.2019.07.091
- Álvarez, A. (2016). *Caracterización físicoquímica de varios residuos agroindustriales y sus mezclas para la producción de biocombustibles*. Tesis de pregrado, Universidad Santo Tomás, Bucaramanga.
- Álvarez, C. (2009). Biocombustibles: Desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Econ. Inf.*(359), 63-89.

- Alves, B., Silva, A., Rodrigues, R., Morais, M., Cezar, R., & Damilano, E. (2017). Recycling the liquid fraction of alkaline hydrogen peroxide in the pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology*, 241, 928-935. doi:10.1016/j.biortech.2017.06.022
- Anu, A., Kumar, A., Kumar, V., & Singh, B. (2021). Cellulosic and hemicellulosic fractions of sugarcane bagasse: Potential, challenges and future perspective. *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, 564-582. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.175
- Arias, R., & Meneses, J. (2016). *Caracterización físico-química de residuos agroindustriales (cascarilla de arroz y cascarilla de café), como materia prima para la obtención de bioetanol*. Tesis de pregrado, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua.
- Asocaña. (2019). *Sector agroindustrial de la caña*. Recuperado el 24 de Junio de 2021, de <https://www.asocana.org/>
- Barón, L. (2014). *Evaluación de la cascarilla de café como material adsorbente para la remoción de iones plomo  $Pb^{2+}$  presente en soluciones acuosas*. Tesis de pregrado, Universidad Libre, Bogotá.
- Barrera, J. (2020). *Evaluación de la cascarilla de café como sustituto a las grasas utilizadas en la elaboración de brownies*. Bogotá: Séneca Repositorio Institucional.
- Barroso, M. (2010). *Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería*. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid.
- Basile, A., & Dalena, F. (2019). *Second and third generation of feedstocks* (Primera ed.). Elsevier.
- Basile, A., Lulianelli, A., Dalena, F., & Veziroglu, N. (2018). *Ethanol* (Primera ed.). Estados Unidos: Elsevier.

- Bekalo, S., & Reinhardt, H. (2009). Fibers of coffee husk and hulls for the production of particleboard. *Materials and Structures*, 43(8), 1049-1060. doi:10.1617/s11527-009-9565-0
- Bellido, C. (2014). Obtención de bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo: Fermentación conjunta de los Penta y Hexa carbohidratos con *Pichia stiptis*. *Tesis doctorales UVa*. doi:10.35376/10324/4556
- Bhatia, S., Jagtap, S., Bedekar, A., Bhatia, R., Patel, A., Pant, D., . . . Yang, Y. (2020). Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. *Bioresource Technology*, 300. doi:10.1016/j.biortech.2019.122724
- Bimestre, T., Mantovani, J., Botura, C., Canettieri, E., & Tuna, C. (2010). Theoretical modeling and experimental validation of hydrodynamic cavitation reactor with a Venturi tube for sugarcane bagasse pretreatment. *Bioresource Technology*, 311, 123540. doi:10.1016/j.biortech.2020.123540
- Bittencourt, G., Barreto, E., Brandao, R., Lobo, B., & Alves, L. (2019). Fractionation of sugarcane bagasse using hydrothermal and advanced oxidative pretreatments for bioethanol and biogas production in lignocellulose biorefineries. *Bioresource Technology*, 292, 121963. doi:10.1016/j.biortech.2019.121963
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K., & Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. *Enzyme Research*, 1-17. doi:10.4061/2011/787532

- Cardona, C., Quintero, J., & Paz, I. (2010). Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*, 101(13), 4754-4766. doi:10.1016/j.biortech.2009.10.097
- Carvajal, A. (2012). *Energía: La nueva agenda del sector azucarero*. Recuperado el 24 de Junio de 2021, de Asocaña: <https://www.asocana.org/>
- Choi, J., Jang, S., Kim, J., Park, S., Kim, C., Jeong, H., . . . Choi, I. (2019). Simultaneous production of glucose, furfural, and ethanol organosolv lignin for total utilization of high recalcitrant biomass by organosolv pretreatment. *Renewable Energy*, 130, 952-960. doi:10.1016/j.renene.2018.05.052
- Cichosz, S., & Masek, A. (2019). Cellulose structure and property changes indicated via wetting-drying cycles. *Polymer Degradation and Stability*, 167, 33-43. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2019.05.033
- Cortes, W. (2011). Materiales lignocelulósicos como fuente de biocombustible y productos químicos. *Tecno Esufa*, 16, 41-46.
- Costa, C., Furlan, F., Cruz, A., de Lima, R., & de Campos, R. (2014). Integrated production of 1G-2G bioethanol and bioelectricity from sugarcane: Impact of bagasse pretreatment processes. En S. Da Silva, & A. Chadel, *Biofuels in Brazil* (págs. 85-95). Brasil: Springer. doi:doi.org/10.1007/978-3-319-05020-1\_5
- Da silva, L. (2015). *Evaluación de diferentes pretratamientos sobre el bagazo de caña de azúcar considerando altas cargas de solidos*. Tesis doctoral, Universidad Estatal de Campinas, Campinas.
- Da Silva, S., & Chandel, A. (2014). *Biofuels in Brazil: Fundamental aspects, recent developments, and future perspectives*. Brasil: Springer. doi:10.1007/978-3-319-05020-1

- DANE. (29 de Septiembre de 2020). *Encuesta nacional agropecuaria*. Recuperado el 24 de Junio de 2021, de ENA: <https://www.dane.gov.co/>
- Dufey, A. (2006). *Biofuels production, trade and sustainable development: emerging issues*. Londres: IIED.
- Estrada, C. (2012). *Energías Alternas: propuesta de investigación y desarrollo tecnológico para México* (Primera ed.). México D.F.: Academia Mexicana de Ciencias ED.
- Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. (s.f.). Recuperado el 29 de Agosto de 2020, de <https://federaciondecafeteros.org/>
- Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. (2019). *Informe de gestión*. Bogotá.
- Firouzi, S., Sadegh, M., Isazadeh, M., Nikkhah, A., & Van Haute, S. (2021). Hybrid multi-criteria decision-making approach to select appropriate biomass resources for biofuel production. *Science of The Total Environment*, 770, 144449. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.144449
- Gomez, S. (23 de Abril de 2019). *Quécafé*. Recuperado el 30 de Agosto de 2020, de Subproductos del café: valor agregado: <https://quecafe.info/usos-alternativos-subproductos-cafe/>
- Guimaraes, J., Frollini, E., Silva, C., Wypych, F., & Satyanarayana, K. (2009). Characterization of banana, sugarcane bagasse and sponge gourd fibers of Brazil. *Industrial Crops and Products*, 30(3), 407-415. doi:10.1016/j.indcrop.2009.07.013
- Hernández, H., Prada, J., Zapara, H., & Cardona, M. (2011). *Atlas del Potencial Energético de la Biomasa Residual en Colombia*. Colombia.
- Hoyos, J., Bello, L., Yee, H., Rodriguez, M., & Aguirre, A. (2017). Characterization of the flour and starch of aroid cultivars grown in México. *Starch-Starke*, 69, 9-10. doi:10.1002/star.201600370

- Huang, C., Zhan, Y., Du, X., Zhou, Y., Yu, L., Meng, X., . . . Ragauskas, A. (2020). Modified alkaline peroxide pretreatment: An efficient path forward for bioethanol production from bamboo. *Energy Conversion and Management*, 224, 113365. doi:10.1016/j.enconman.2020.113365
- Isern, X. (2014). La humedad en la biomasa: herramientas de medida y control. *Energética*, 4-7.
- Kim, H., Choi, Y., Lee, D., Kim, Y., & Bae, H. (2017). Production of bio-sugar and bioethanol from coffee residue (CR) by acid-chlorite pretreatment. *Bioresource Technology*, 236, 194-201. doi:10.1016/j.biortech.2017.03.143
- Kumar, B., Bhardwaj, N., Agrawal, K., Chaturvedi, V., & Verma, P. (2020). Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. *Fuel Processing Technology*, 199, 106244. doi:10.1016/j.fuproc.2019.106244
- Li, Y., Cui, J., Zhang, G., Liu, Z., Guan, H., Hwang, H., . . . Wang, P. (2016). Optimization study on the hydrogen peroxide pretreatment and production of bioethanol from seaweed *Ulva prolifera* biomass. *Bioresource Technology*, 214, 144-149. doi:10.1016/j.biortech.2016.04.090
- Mankar, A., Pandey, A., Modak, A., & Pant, K. (2021). Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. *Bioresource Technology*, 334, 1225235. doi:10.1016/j.biortech.2021.125235
- Meenaskshisundaram, S., Fayeulle, A., Leonard, E., Ceballos, C., & Pauss, A. (2021). Fiber degradation and carbohydrate production by combined biological and chemical/physicochemical pretreatment methods of lignocellulosic biomass - A review. *Bioresource Technology*, 331, 1250523. doi:10.1016/j.biortech.2021.125053

- Melissari, B. (2012). Comportamiento de cenizas y su impacto en sistemas de combustión de biomasa. *Memoria de Trabajos de Difusión Científica y Técnica*(10), 69-82.
- Menezes, F., Rocha, G., & Filho, R. (2016). Obtainment and characterization of lignin from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse of 2G ethanol process in pilot scale. *AIDIC*, 50, 397-402. doi:10.3303/CET1650067
- Mohapatra, S., Dandapat, S., & Thatoi, H. (2017). Physicochemical characterization, modelling and optimization of ultrasono-assited acid pretreatment of two Pennisetum sp. using Taguchi and artificial neural networking for enhanced delignification. *Journal of Environmental Management*(181), 537-549. doi:10.1018/j.jenvman.2016.09.060
- Moncada, O., & Castro, S. (2016). *Caracterización de mezclas de residuos lignocelulósicos, raquis de palma africana y bagazo de caña, para visualizar su potencial en la producción de etanol de segunda generación*. Tesis de pregrado, Universidad Santo Tomás, Bucaramanga.
- Montaño, H. (2014). *Producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico de Moringa Oleífera*. Tesis de maestria , Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Monteiro, S., Barbosa, L., Ferreira, J., Trindade, S., & Derengowski, M. (2016). *Global Bioethanol: Evolution, Risk, and Uncertainties* (Primera ed.). Estados Unidos: Academic Press Inc.
- Moraes, G., Nascimento, V., Goncalves, A., Nunes, V., & Martín, C. (2015). Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical–chemical composition. *Industrial Crops and Products*, 64, 52-58. doi:10.1016/j.indcrop.2014.11.003

- Murthy, P., & Naidu, M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 66, 45-58. doi:10.1016/j.resconrec.2012.06.005
- National Renewable Energy Laboratory. (s.f.). *NREL*. Recuperado el 15 de Septiembre de 2020, de <https://www.nrel.gov/>
- Nguyen, Q., Cho, E., Trinh, L., Jeong, J., & Bae, H. (2017). Development of an integrated process to produce d-mannose and bioethanol from coffee residue waste. *Bioresource Technology*, 244, 1039-1048. doi:10.1016/j.biortech.2017.07.169
- Pereira, S., Maehara, L., Machado, C., & Farinas, C. (2016). Physical, chemical and morphological characterization of the whole sugarcane lignocellulosic biomass used for 2G ethanol production by spectroscopy and microscopy techniques. *Renew Energy*, 87, 607-617. doi:10.1016/j.renene.2015.10.054
- Pernalet, Z., Piña, F., Suárez, M., Ferrer, A., & Aiello, C. (2008). Fraccionamiento del bagazo de caña de azúcar mediante tratamiento amoniacal: efecto de la humedad del bagazo y la carga de amoníaco. *Bioagro*, 20(1), 3-10.
- Plaza, J., Daza, C., Coral, E., García, A., & Villafuerte, R. (2015). Design, construction and implementation of a low cost solar-wind hybrid energy system. *IEEE Latin America Transactions*, 13(10), 3304-3309. doi:10.1109/tla.2015.7387235
- Portafolio. (30 de Enero de 2020). *Economía*. Recuperado el 24 de Junio de 2021, de Sector agroindustrial, el más productivo de 2019: <https://www.portafolio.co/>
- Qiu, J., Tian, D., Shen, F., Hu, J., Zeng, Y., Yang, G., . . . Zhang, J. (2018). Bioethanol production from wheat straw by phosphoric acid plus hydrogen peroxide (PHP) pretreatment via

- simultaneous saccharification and fermentation (SSF) at high solid loadings. *Bioresource Technology*, 268, 355-362. doi:10.1016/j.biortech.2018.08.009
- Ramadoss, G., & Murthukumar, K. (2015). Influence of dual salt on the pretreatment of sugarcane bagasse with hydrogen peroxide for bioethanol production. *Chemical Engineering Journal*, 260, 178-187. doi:10.1016/j.cej.2014.08.006
- Residuos profesional. (Mayo de 2017). Recuperado el 24 de Junio de 2021, de Residuos de la caña de azúcar para producir papel reciclado, películas y geles: <https://www.residuosprofesional.com/>
- Rodríguez, F., Sanchez, A., & Amaya, L. (2019). Xylooligosaccharides production from lignocellulosic biomass using a pilot-scale pretreatment continuous tubular reactor. Modelling and experimental validation. *Industrial Crops and Products*, 134, 62-70. doi:10.1016/j.indcrop.2019.03.058
- Rosendahl, L. (2013). *Biomass Combustion Science, Technology and Engineering: A volume in Woodhead Publishing Series in Energy* (Primera ed.). Woodhead Publishing.
- Sector agroindustrial de la caña. (2019). *Aspectos generales del sector agroindustrial de la caña*. Colombia: Asocaña.
- Skoog, D., Holler, J., & Nieman, T. (2001). *Principios de análisis instrumental* (Quinta ed.). Madrid: McGraw Hill.
- Sluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., . . . Wolfe, J. (2018). *Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples*. Recuperado el 15 de Septiembre de 2020, de National Renewable Energy Laboratory: <https://www.nrel.gov/>

- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2005). *Determination of Ash in Biomass*. Recuperado el 20 de Septiembre de 2020, de National Renewable Energy Laboratory: <https://www.nrel.gov/>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2011). *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass*. Recuperado el 20 de Septiembre de 2020, de National Renewable Energy Laboratory: <https://www.nrel.gov/>
- Suarez, S., Candela, A., Henao, J., & Bayona, O. (2019). Evaluación del desempeño del pretratamiento con peróxido de hidrógeno sobre el bagazo de caña de azúcar con remoción de lignina. *Iteckne*, 16, 18-21.
- Sun, R. (2010). *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*. Elsevier. doi:10.1016/C2009-0-06759-2
- Tang, S., Liu, W., Huang, C., Lai, C., Fan, Y., & Yong, Q. (2019). Improving the enzymatic hydrolysis of larch by coupling water pre-extraction with alkaline hydrogen peroxide post-treatment and adding enzyme cocktail. *Bioresource Technology*, 285, 121322. doi:10.1016/j.biortech.2019.121322
- Tian, S., Zhao, R., & Chen, Z. (2018). Review of the pretreatment and bioconversion of lignocellulosic biomass from wheat straw materials. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 483-489. doi:10.1016/j.rser.2018.03.113
- Usmani, Z., Sharma, M., Kumar, A., Lukk, T., Tuohy, M., Gong, L., . . . Kumar, V. (2021). Lignocellulosic biorefineries: The current state of challenges and strategies for efficient commercialization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 148, 111258. doi:10.1016/j.rser.2021.111258

Van Dam, J. (2016). Subproductos de la palma de aceite como materias primas de biomasa. *Revista Palmas*, 37, 149-156.

Wallas, S. (1990). *Chemical process equipment selection and design* (Primera ed.). USA: Butterworth-Heinemann.

Yousuf, A., Pirozzi, D., & Sannino, F. (2019). *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels*. Academic Press.