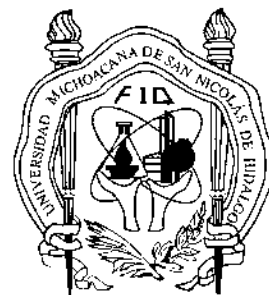




UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

“Evaluación de las condiciones de pretratamiento ácido para mezclas de
rastrojo de maíz, paja de trigo y paja de sorgo dulce”

Tesis para obtener el grado de Ingeniero Químico

PRESENTA:

STEPHANIE MENDOZA VALENCIA

ASESOR:

DRA. ANA ALEJANDRA VARGAS TAH

COASESOR:

DR. AGUSTÍN JAIME CASTRO MONTOYA

Morelia, Michoacán. México.

Octubre 2019



DEDICO ESTE TRABAJO,

A mi hermana Betty, por ser mi mejor ejemplo a seguir y mi mayor motivación, por el apoyo incondicional que me brinda, porque siempre ha estado conmigo en todas las adversidades y hemos crecido juntas, porque gracias a ella pude concluir ésta etapa.

A mi madre, que me inculcó valores y me permitió elegir este camino que me llena por completo, y que es mi razón para ser siempre su orgullo, que me acercó a Dios en todo momento para ser agradecida y tener la fortaleza de continuar.

AGRADEZCO,

A la Facultad de Ingeniería Química, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, y a todos los excelentes profesores que me formaron durante todos estos años.

Al Posgrado de Ingeniería Química, por permitirme usar sus instalaciones para la realización de mi trabajo, en especial a los miembros del laboratorio beta, por la ayuda y ambiente reconfortante durante el transcurso.

Al Dr. Agustín Jaime Castro, por la confianza, facilidades, asesoría y apoyo otorgado en la realización de este trabajo.

A la Dra. Ana Alejandra Vargas por su paciencia, motivación y docencia, por su compañía, asesoría y todas sus enseñanzas que me permitieron concluir este trabajo.

A mis grandes amigos y compañeros de generación por su amistad y apoyo incondicional, por ser siempre mi equipo y la mejor parte durante mi formación en la facultad.

Gracias.



Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE ECUACIONES	9
RESUMEN	10
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 GENERALIDADES	11
1.2 ANTECEDENTES	13
1.2.1 Biomasa.....	13
1.2.2 Carbohidratos	14
1.2.3 Selección de materiales lignocelulósicos	16
1.2.3.1 Descripción y Situación Nacional.....	16
1.2.3.2 Rastrojo de Trigo	18
1.2.3.3 Rastrojo de Maíz.....	19
1.2.3.4 Paja de Sorgo Dulce	20
1.2.4 Métodos de pretratamiento	22
1.2.5 Condiciones de Pretratamiento con Ácido Diluido (Sulfúrico)	27
1.2.6 Composición de materiales lignocelulósicos	28
1.2.6.1 Celulosa.....	30
1.2.6.2 Hemicelulosa.....	30
1.2.6.3 Lignina.....	30
1.2.7 Antecedentes del Pretratamiento de Rastrojo de Trigo	31
1.2.8 Antecedentes del Pretratamiento de Rastrojo de Maíz:.....	32
1.2.9 Antecedentes del Pretratamiento de Paja de Sorgo Dulce:	33
CAPÍTULO 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
2.1 JUSTIFICACIÓN.....	34
2.2 HIPÓTESIS.....	34



2.3	OBJETIVOS.....	34
2.3.1	<i>Objetivo General</i>	34
2.3.2	<i>Objetivos Particulares:</i>	35
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA		36
3.1	PROCESO DE INVESTIGACIÓN.....	36
3.1.1	<i>Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC)</i>	36
3.2	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	38
3.2.1	<i>Metodología</i>	38
3.2.1.1	Análisis Estadístico.....	38
3.3	ANÁLISIS Y PROCEDIMIENTOS.....	40
3.3.1	<i>Molido y Tamizado</i>	40
3.3.2	<i>Determinación de Sólidos Totales</i>	40
	Procedimiento de determinación de sólidos totales:.....	41
	Cálculos de sólidos totales	42
3.3.3	<i>Determinación de cenizas en biomasa</i>	42
	Procedimiento.....	43
	Cálculos para determinación de cenizas.....	44
3.3.4	<i>Determinación de carbohidratos estructurales y lignina en biomasa</i>	45
	Procedimiento.....	45
	Análisis de lignina insoluble en ácido.....	49
3.3.4.1	Análisis de lignina soluble en ácido.....	50
3.3.4.2	Análisis la muestra de carbohidratos estructurales.....	50
	Cálculos para determinación de lignina y carbohidratos estructurales:	52
3.3.5	<i>Pretratamiento con ácido diluido H_2SO_4</i>	56
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		58
4.1	RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS: PAJA DE TRIGO, RASTROJO DE MAÍZ Y SORGO DULCE	58
4.2	RESULTADOS DE LA HIDRÓLISIS TERMOQUÍMICA.....	59
4.3	RECUPERACIÓN DE XILANOS.....	60
4.4	RECUPERACIÓN DE ARABINOSA.....	62



4.5	RECUPERACIÓN DE GLUCOSA.....	63
4.6	RECUPERACIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO	65
4.7	RECUPERACIÓN DE HIDROXIMETILFURFURAL.....	67
4.8	ANÁLISIS DEL ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	69
CONCLUSIONES		75
BIBLIOGRAFÍA.....		76



Índice de Figuras

Figura 1. Esquema básico de composición de biomasa.	13
Figura 2. Carbohidratos estructurales y compuestos de degradación de azúcares en materiales lignocelulósicos.	15
Figura 3. Productos de obtención a partir de Carbohidratos estructurales.....	16
Figura 4. Componentes de la planta de Trigo.....	18
Figura 5. Componentes de la planta de Maíz.....	20
Figura 6. Componentes de la planta de Sorgo Dulce.....	21
Figura 7. Comparación de la biomasa lignocelulósica sin y con un pretratamiento hidrotérmico. ...	22
Figura 8. Pretratamientos para materia prima lignocelulósica.	23
Figura 9. Diagrama del sistema de pretratamiento con H ₂ SO ₄ diluido a escala piloto.	27
Figura 10. Representación esquemática de la organización de los diferentes biopolímeros de la pared celular de una angiosperma no leñosa.....	29
Figura 11. Esquema de composición de materiales lignocelulósicos.....	29
Figura 12. Efecto de la temperatura (140,160 y 180°C) y de la dosis de ácido (0,0, 0,25 y 0,5%, v/v) sobre la liberación de glucosa (A), xilosa (B), azúcares totales (C) y ácido acético (D).....	31
Figura. 13. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la liberación de xilosa y glucosa de rastrojo de maíz blanco y en formación de furano.....	32
Figura 14. Azúcares liberados a diferentes concentraciones de ácido, tiempo de reacción (t) y temperatura (T).....	33
Figura 15. Diagrama de cromatografía de líquidos de alta eficiencia HPLC.	36
Figura 16. Diagrama de bloques que muestra los componentes de un aparato característico de CLAR. (Cortesía de Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT).....	37
Figura 17. Metodología	38
Figura 18. Puntos aumentados de las fracciones másicas consideradas para el diseño de mezcla de los efectos de paja de trigo, rastrojo de maíz y paja de sorgo dulce.....	39
Figura 19. Molido y tamizado de los materiales a) Molido b) Malla de tamizado c) Tamizador	40



Figura 20. Horno de secado.....	41
Figura 21. Mufla.....	43
Figura 22. Producto de cenizas de los materiales	44
Figura 23. Cromatografo de líquidos de alta eficiencia HPLC	46
Figura 24. Muestras de materiales lignocelulósicos.....	46
Figura 25. Caracterización etapa 1.....	47
Figura 26. Caracterización etapa 2.....	47
Figura 27. Preparación de la hidrólisis para la caracterización.....	48
Figura 28. Filtrado de hidrolizados.....	49
Figura 29. Evidencia de lignina insoluble de los hidrolizados.....	50
Figura 30. Concentraciones de Xilosa en la hidrólisis ácida de los materiales lignocelulósicos y sus mezclas.....	61
Figura 31. Concentración de Arabinosa de los materiales lignocelulósicos y sus mezclas	63
Figura 32. Concentración de Glucosa de los materiales lignocelulósicos y sus mezclas.....	65
Figura 33. Concentración de Ácido acético de las mezclas de materiales lignocelulósicos	67
Figura 34. Concentración de 5- hidroximetilfurfural de las mezclas de materiales lignocelulósicos	69
Figura 35. Análisis comparativo de mg/mL de Xilosa a tiempos (0, 10, 20, 30 min)	71
Figura 36. Representación gráfica Simplex con Centroides ampliado en mg/mL de Xilosa a t=30 min	72



Índice de Tablas

Tabla 1. Producción de grano y estimación de producción de Rastrojo de cuatro cultivos en México, periodo 2008-2011.....	17
Tabla 2. Producción de Trigo en México. (FAO, 2017)	19
Tabla 3. Producción de Maíz en México (FAO, 2017).....	20
Tabla 4. Producción de Sorgo en México (FAO, 2017).....	21
Tabla 5. Diferentes condiciones de Operación y efectos de los principales métodos de pretratamiento	25
Tabla 6. Constantes de absorbtividad para la medición de lignina soluble en ácido para determinados tipos de biomasa.....	53
Tabla 7. Proporción de material en las muestras (peso seco).....	56
Tabla 8. Caracterización de los materiales lignocelulósicos utilizados ^a	58
Tabla 9. Composición de algunos cultivos energéticos potenciales	58
Tabla 10. Contenido máximo teórico de carbohidratos estructurales calculado para hidrólisis de 40 g de mezcla, considerando una carga de sólidos del 15 % p/p.	59
Tabla 11. Porcentaje de recuperación de Xilosa de mezclas por hidrólisis ácida H ₂ SO ₄ al 2% y 15%p/p.....	60
Tabla 12. Porcentaje de recuperación de Arabinanos en las muestras	62
Tabla 13. Porcentaje de recuperación de Glucanos en las muestras.....	64
Tabla 14. Concentraciones de acético obtenido de la hidrólisis ácida al 2% de H ₂ SO ₄	66
Tabla 15. Concentraciones de hidroximetilfurfural obtenidas de la hidrólisis ácida al 2% de H ₂ SO ₄	68
Tabla 16. Concentraciones de Xilosa obtenidas de la hidrólisis ácida al 2% de H ₂ SO ₄	70
Tabla 17. Mezclas de comprobación de modelos matemáticos	73
Tabla 18. Comparación de resultados de concentraciones por método de HPLC y modelos matemáticos.....	74



Índice de Ecuaciones

Ecuación 0. Ecuación de diseño Simplex con Centroide Ampliado para 3 variables de mezcla	39
Ecuación 1. Determinación del porcentaje de sólidos totales.....	42
Ecuación 2. Porcentaje de humedad	42
Ecuación 3. Determinación de peso seco en horno (ODW)	44
Ecuación 4. Porcentaje de cenizas en una base ODW.....	45
Ecuación 5. Porcentaje en peso de residuo insoluble en ácido (AIR)	52
Ecuación 6. Porcentaje de lignina insoluble en ácido (AIL) sobre una base libre de extractos.	52
Ecuación 7. Cantidad de lignina soluble en ácido (ASL).....	52
Ecuación 8. Cálculo de dilución.....	53
Ecuación 9. Cantidad total de lignina libre.....	54
Ecuación 10. Cantidad de cada estándar de verificación de calibración recuperado.....	54
Ecuación 11. Concentración de los azúcares poliméricos a partir de la concentración de los azúcares monoméricos correspondientes.....	54
Ecuación 12. Porcentaje de cada azúcar libre.....	54
Ecuación 13. Porcentaje de acetato libre.....	55
Ecuación 14. Diferencia porcentual relativa (RPD) entre dos muestras.....	55
Ecuación 15. Raíz cuadrada media (RMS) de la muestra.....	56
Ecuación 16. Desviación cuadrática media.....	56
Ecuación 17. Modelo obtenido sobre el comportamiento de hidrólisis ácida a 30 min para mezcla de tres componentes.	73
Ecuación 18. Modelo obtenido sobre el comportamiento de hidrólisis ácida a 20 min para mezcla de tres componentes.	73



Resumen

Evaluación de las condiciones de pretratamiento ácido para mezclas de rastrojo de maíz, paja de trigo y paja de sorgo dulce

La biomasa lignocelulósica es una importante fuente de energía renovable con potencial en la producción de biocombustibles, cogeneración de energía eléctrica y generación de compuestos químicos de valor agregado. Se han realizado estudios del pretratamiento con ácido diluido de cada uno de los materiales lignocelulósicos existentes, sin embargo, no hay información sobre el uso de mezclas de materiales con las cuales sea posible cubrir la demanda para la producción de bioproductos en cualquier temporada del año.

El presente trabajo de tesis muestra un estudio con una carga inicial de 15% p/p de distintas mezclas de rastrojo de maíz, paja de trigo y sorgo dulce para evaluar el efecto en el pretratamiento con ácido diluido, diseñado para liberar la máxima cantidad de xilosa de su estructura hemicelulósica y cantidades mínimas de furanos. Se encontró que hasta un 86.4% de Xilanos puede recuperarse como xilosa libre en ciertas mezclas, a 130°C, después de 30 minutos en presencia de 2% w/w de H₂SO₄ y produciendo sólo 3 a 6 mg/mL de furanos.

Abstract

Lignocellulosic biomass is an important source of renewable energy with potential to be used in the production of biofuels, cogeneration of electrical energy and generation of value-added chemical compounds. Diluted acid pre-treatment studies have been performed on each of the existing lignocellulosic materials; however, there is not information about the use of mixtures of materials with which it is possible to cover the demand for the production of bioproducts in any season of the year.

The present work shows a study with an initial load of 15% w/w of different mixtures of corn stover, wheat straw and sweet sorghum to evaluate the effect in the pre-treatment with diluted acid, designed to release the maximum amount of xylose from its hemicellulosic structure and minimum amounts of furans. It was found that up to 86.4% of xylans can be recovered as free xylose in certain mixtures, at 130°C, after 30 minutes in the presence of 2% w/w H₂SO₄ and producing only 3 to 6 mg/mL of furans.

Palabras clave: biomasa, hidrólisis ácida, carbohidratos estructurales, hemicelulosa, bioproductos.



Capítulo 1. Introducción

1.1 Generalidades

En la actualidad la generación de alternativas energéticas distintas a las ya convencionales, ha conllevado al uso de materias primas naturales, dando lugar a bioproductos formados a partir de residuos agroindustriales y orgánicos como lo es la biomasa; los cuales son una alternativa adecuada, dada la necesidad de disminuir la dependencia de los combustibles fósiles (*Banerji et al.*, 2013). Los residuos orgánicos agrícolas como rastrojo o paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, raquis, fibra, cuesco de palma africana, paja de arroz, paja de trigo, paja de maíz, el pelo de semilla de algodón, hoja de piña, tallo de plátano, álamo, compuestos de lignina y celulosa son considerados actualmente uno de los principales problemas de la agricultura desde el punto de vista ambiental al verlos como un desecho, y los cuales en ocasiones únicamente se destinan a quema de residuos agrícolas (*Reyes-Muro et al.*, 2013).

La biomasa lignocelulósica es una importante fuente de energía renovable con potencial en la producción de biocombustibles, cogeneración de energía eléctrica y generación de compuestos químicos, algunos de estos energéticos, entre otras aplicaciones (*Ventura et al.*, 2012). En el contexto actual, con el aumento por políticas medioambientales y con la biomasa bien distribuida alrededor del mundo, la opción por extender el uso de este recurso renovable debe ser considerada seriamente (*Cortínez*, 2010).

El aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica para la generación de productos de valor agregado a partir de sus fracciones constituyentes como la hemicelulosa y la celulosa, requiere en primera instancia la eliminación de las barreras, que dificultan el acceso de catalizadores químicos o biológicos que contribuyen a su transformación, mediante algún método de pretratamiento, con el fin de obtener una mayor velocidad de reacción y mejores rendimientos (*Ventura et al.*, 2012).

El fraccionamiento de la biomasa o los materiales lignocelulósicos y la utilización de cada componente por separado es la actual filosofía principalmente de las biorefinerías (*Ventura et al.*, 2012). Sin embargo, se tiene el problema de que la cosecha de un solo material lignocelulósico no es suficiente para cubrir la demanda. Esto debido a las condiciones agroclimáticas que se



requieren para su cultivo en las diversas estaciones del ciclo agrícola (primavera-verano, otoño-invierno) e incluso la cantidad insuficiente producida de cada material por región.

Teniendo en cuenta el contexto anterior, se plantea la necesidad de evaluar las condiciones de pretratamiento con ácido sulfúrico de las mezclas de tres materiales lignocelulósicos, en diversas proporciones másicas, para conocer si es posible obtener un rendimiento mayor o equivalente al de sus componentes por separado.



1.2 Antecedentes

1.2.1 Biomasa

El término biomasa es utilizado para describir todo material orgánico renovable tanto de origen animal o vegetal; entre ellos se encuentran plantas, árboles, cosechas, residuos agrícolas y forestales. Un ejemplo de su estructura puede verse en la Figura 1. En el mundo se extrae cerca del 11% de la energía desde la biomasa, esto corresponde a cerca de 44 EJ (exajoules= 10^{18} Joules), donde la forma más tradicional de uso es la quema, pero el potencial de biomasa es bastante significativo alcanzando el valor de 2900 EJ considerados técnicamente disponibles (Cortínez, 2010).

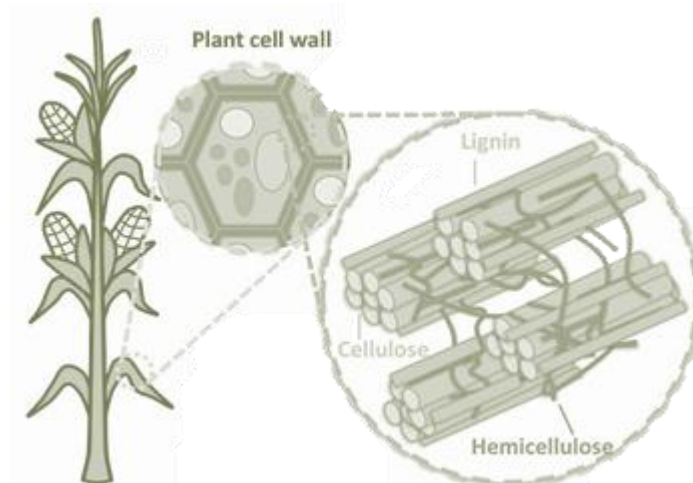


Figura 1. Esquema básico de composición de biomasa.

El ciclo de la biomasa se inicia con la luz solar, que hace posible la fotosíntesis que realizan los árboles y plantas. Posteriormente, las plantas son cosechadas y los árboles son talados de los cuales su madera y frutos se utilizan como materia prima, los restos sobrantes, como las astillas, el serrín, hojas y tallos son utilizados como material lignocelulósico para su transformación en bioproductos y uso energético. Durante estos procesos, se libera metano



(CH₄), óxido nitroso (N₂O) y, dióxido de carbono (CO₂) a la atmósfera el cual es absorbido por otros árboles y plantas, comenzando de nuevo el ciclo de la biomasa.

En el contexto energético, la biomasa puede considerarse como la materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable para la generación de productos de valor agregado. Estos recursos provenientes de la biomasa pueden agruparse de forma general en agrícolas y forestales (APPA Biomasa, 2018).

En principio, existen dos opciones para abastecer la demanda de materiales lignocelulósicos. Una primera opción consistiría en aprovechar los residuos agrícolas o procedentes de la madera, aunque estos residuos parecen a todas luces insuficientes (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO, 2008), por lo que los procesos de segunda generación podrían ser más rentables si se integrasen en las instalaciones manufactureras existentes, por ejemplo de fabricación del papel, que producen biomasa barata o subproductos de biomasa. La segunda opción es crear una reserva forestal mediante plantaciones para abastecer las necesidades de materia prima. La biomasa lignocelulósica es la materia prima renovable más abundante, su producción anual se ha estimado 1×10^{10} millones de toneladas alrededor del mundo (Faba *et al.*, 2014).

1.2.2 Carbohidratos

A nivel mundial, se producen a partir de carbohidratos algunos de los compuestos que son la base para reemplazar a todos aquellos provenientes de las refinerías tradicionales. El etanol, el etileno, el ácido láctico, 1,3-propanediol, ácido succínico, ácido itacónico y aceites microbianos ya se comercializan, mientras que el ácido acrílico, 1,4-butanediol, ácido 2,4-diaminobutírico, n-butanol, ácido fumárico, ácido 2,5-furandicarboxílico y el ácido adípico se encuentran en desarrollo (Piñeros, 2016). Algunos de estos pueden observarse en la Figura 2.

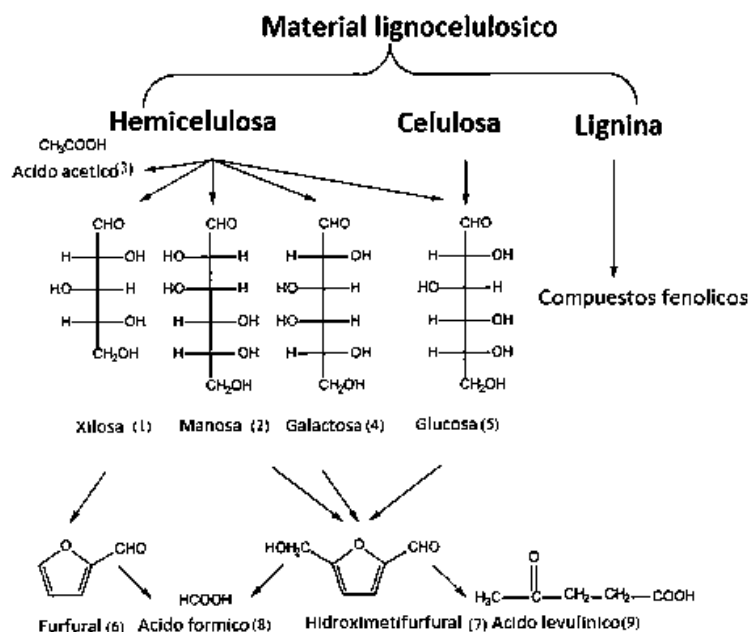


Figura 2. Carbohidratos estructurales y compuestos de degradación de azúcares en materiales lignocelulósicos.

Algunos de los productos de valor agregado es la producción de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) a partir del cual podremos producir compuestos derivados, como 2,5-furfurildiamina, 2,5-furfurildiisocianato y 5-hidroximetilfurfurildienéster, los cuales son apropiados para su uso como materias primas en la preparación de materiales poliméricos como poliésteres, poliamidas y poliuretano. La síntesis del 5-HMF es muy compleja debido a que es un producto intermedio en la reacción de producción de ácido levulínico y ácido fórmico desde azúcares (Piñeros, 2016).

La lignina al ser un material polifenólico tridimensional es altamente ramificada con una gran variedad de grupos funcionales que proporcionan centros activos para interacciones químicas y biológicas. Estos grupos funcionales incluyen los hidroxilos fenólicos, hidroxilos alifáticos, metoxilos, carbonilos, carboxilos y sulfonatos; lo que la convierte en el único recurso renovable en el mundo que contiene compuestos aromáticos (disponible en grandes volúmenes); por esta razón los productos de la despolimerización de la lignina, pueden ser utilizados como intermediarios para la obtención de moléculas con anillos aromáticos en su estructura. (ácido gálico y ácido ferúlico) (Piñeros, 2016).

La hemicelulosa es el segundo polisacárido natural que se encuentra (entre un 20 y 35%) en la biomasa lignocelulósica. Está compuesta principalmente de pentosas, hexosas, ácido glucurónico y residuos de ácido galacturónico. Los monosacáridos que conforman la hemicelulosa pueden emplearse para la síntesis de una variedad de compuestos como ácido levulínico, arabitol, xilitol, sorbitol, ácido glucárico, entre otros (Piñeros, 2016). La Figura 3 muestra un esquema general de los productos que pueden formarse a partir de la celulosa y hemicelulosa.

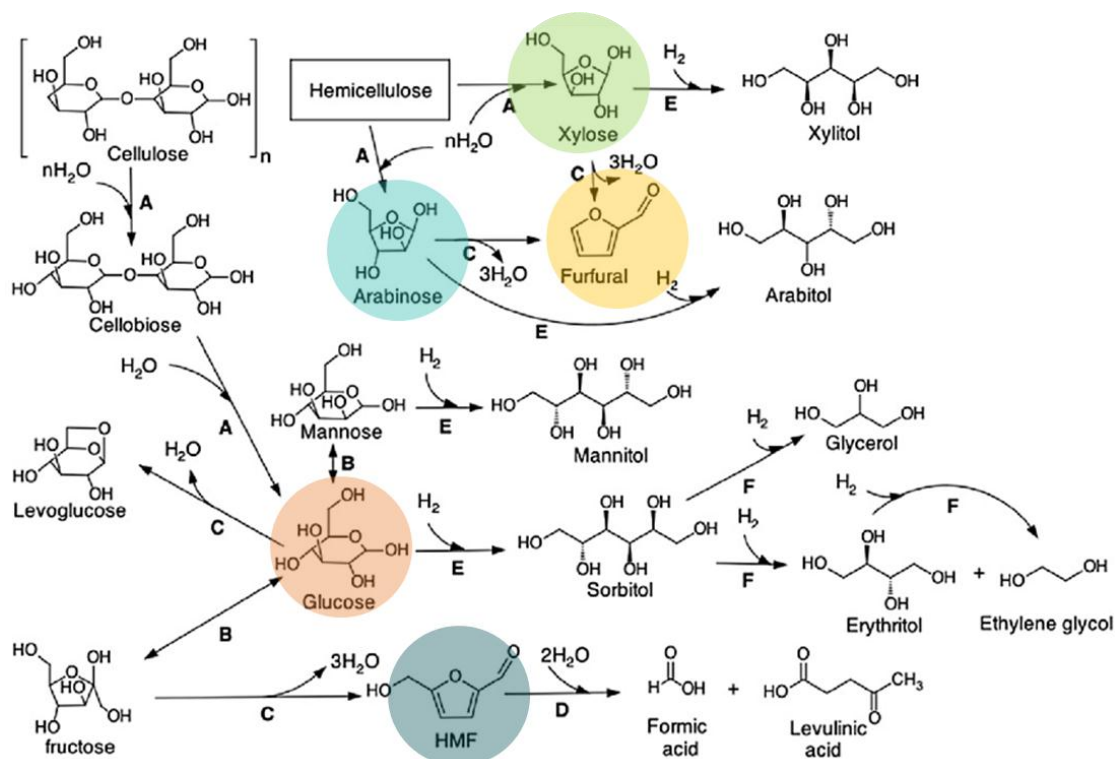


Figura 3. Productos de obtención a partir de Carbohidratos estructurales

1.2.3 Selección de materiales lignocelulósicos

1.2.3.1 Descripción y Situación Nacional

Los rastrojos o residuos de cosecha son subproductos derivados de las actividades agrícolas, y se les considera como la porción del cultivo cosechado (hojas, tallos, espigas y brácteas de la mazorca) que queda después de extraer el grano (Shanahan et al., 2010 y Secretaria de



Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación en la República Mexicana (SAGARPA, 2009). En México, la mayor producción de rastrojos se obtiene de los cereales y está asociada directamente con la producción de grano, por lo que, a medida de que aumenta la cantidad producida de granos para satisfacer la demanda alimenticia de la población, se incrementa la disponibilidad de estos residuos (Reyes *et al.*, 2013).

Los principales estados productores son: Sinaloa, Guanajuato, Jalisco, Tamaulipas y Michoacán. El cálculo de la producción de rastrojo de cada cultivo, se obtuvo dividiendo la producción de grano entre la proporción ponderada de rendimiento de grano por hectárea; el resultado se multiplicó por 100 y se le restó la producción de grano como se puede ver en la Tabla 1 (Reyes *et al.*, 2013).

Tabla 1. Producción de grano y estimación de producción de Rastrojo de cuatro cultivos en México, periodo 2008-2011. (Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta SIACON – Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP 2011)

Producción (t)		
	Grano	Rastrojo
Maíz	21, 372, 598	25, 089, 571
Sorgo	6, 517, 668	7, 349, 711
Trigo	3, 908, 481	4, 407, 436
Cebada	614, 961	693, 467

De acuerdo a la información proporcionada por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación en la República Mexicana (SAGARPA), tenemos que los 3 cultivos de granos básicos más importantes a nivel nacional son en el orden siguiente: el maíz, sorgo y trigo (Reyes *et al.*, 2013).

1.2.3.2 *Rastrojo de Trigo*

Los componentes de la Planta de trigo hojas, espiga, tallo prim ario, tallo secundario, corona y raíces se pueden observar en la Figura 4.

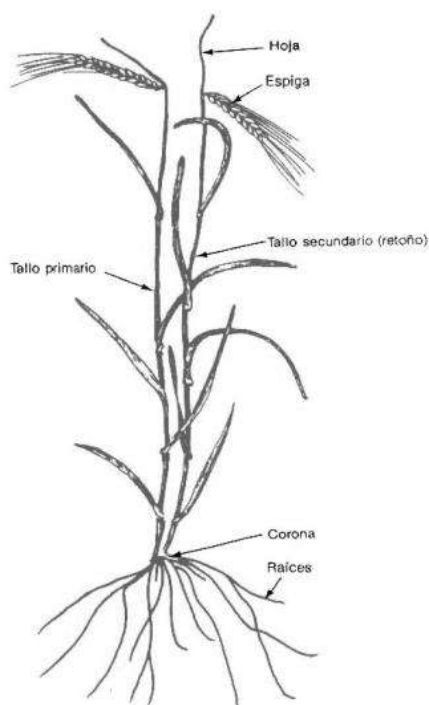


Figura 4. Componentes de la planta de Trigo

La producción nacional en México de trigo durante los últimos años asciende a 3.6 millones de toneladas al año, en promedio. Este cultivo ocupa el 5 % de la superficie sembrada del país. Según los datos de la FAO, 3.494 millones de toneladas métricas de trigo fue producido en los México en 2017 (Mundial Producción, 771.71 millones de toneladas métricas) como se observa en la Tabla 2 (FAOSTAT, 2019).



Tabla 2. Producción de Trigo en México. (FAO, 2017)

2014/15	2015/16	2016/17	2017/18
<i>Millones de Toneladas</i>			
3.682	3.711	3.884	3.494

En muchos países, incluido Estados Unidos, la paja de trigo es un subproducto abundante de la producción de trigo. La media del rendimiento de la paja de trigo es de 1.3 a 1.4 libras por lb de grano de trigo (Saha *et al.*, 2005).

1.2.3.3 *Rastrojo de Maíz*

En México, el maíz es el cultivo más importante desde el punto de vista alimentario, industrial, político y social; de igual manera, es el más significativo por la superficie sembrada y el volumen de producción. Anualmente se destinan 7.8 millones de hectáreas para la producción de este grano, que representa 49.7% de la superficie nacional cultivable (Reyes *et al.*, 2013).

Los componentes de la Planta de Maíz de la parte área donde se encuentran las hojas, espiga, elote/mazorca, tallo; así como de la parte subterránea donde se encuentran sus raíces se pueden observar en la Figura 5.

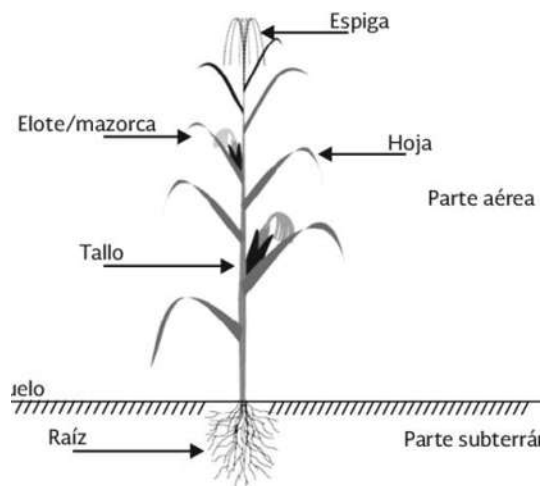


Figura 5. Componentes de la planta de Maíz

Según los datos de la FAO, 27.762 millones de toneladas métricas de maíz fue producido en México en 2017 (Producción Mundial, 1,134.7 millones de toneladas métricas) como se observa en la Tabla 3 (FAOSTAT, 2019).

Tabla 3. Producción de Maíz en México (FAO, 2017)

2014/15	2015/16	2016/17	2017/18
<i>Millones de Toneladas</i>			
23.273	24.694	28.250	27.762

1.2.3.4 Paja de Sorgo Dulce

Es el quinto cultivo de cereales, con una producción mundial de más de 55 millones de toneladas en 2008 (FAOSTAT, 2019). La mayoría de las variedades son resistentes al calor y a la sequía, lo que lo convierte en un cultivo de gran relevancia en zonas desérticas.



Los componentes de la Planta de Sorgo Dulce como las hojas bandera, espiga, pedúnculo, follor o tallo, vaina/ramas y raíces se pueden observar en la Figura 6.

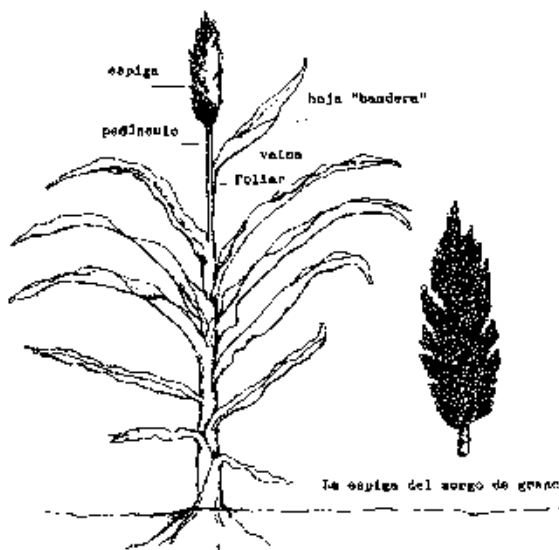


Figura 6. Componentes de la planta de Sorgo Dulce

Según los datos de la FAO, 4.853 millones de toneladas métricas de sorgo fue producido en los México en 2017 (Producción Mundial, 57.601588 millones de toneladas métricas) como se observa en la tabla 4 (FAOSTAT, 2019).

Tabla 4. Producción de Sorgo en México (FAO, 2017)

2014/15	2015/16	2016/17	2017/18
<i>Millones de Toneladas</i>			
8.394	5.195	5.005	4.853



1.2.4 Métodos de pretratamiento

Se le denomina pretratamiento al conjunto de acciones para mejorar el rendimiento en la obtención de azúcares fermentables desde la biomasa inicial. Cualquier mejora que se haga en los procesos mostrados debe reflejarse en un mayor rendimiento y economía (Guarnizo *et al.*, 2009).

El pretratamiento permite la reducción del tamaño de las fibras, además es un proceso esencial para reducir los gastos energéticos y aumentar la accesibilidad de reactivos y enzimas. El objetivo principal de los pretratamientos es aumentar la porosidad de las partículas de biomasa y facilitar la accesibilidad de enzimas hidrolíticas a la celulosa tras desacoplamiento de lignina y hemicelulosa de las microfibras de celulosa. La Figura 7 muestra imágenes de alta definición que ilustran los cambios superficiales de la pared celular de paja de trigo sin pretratamiento y con pretratamiento hidrotérmico (Prinsen, 2012).

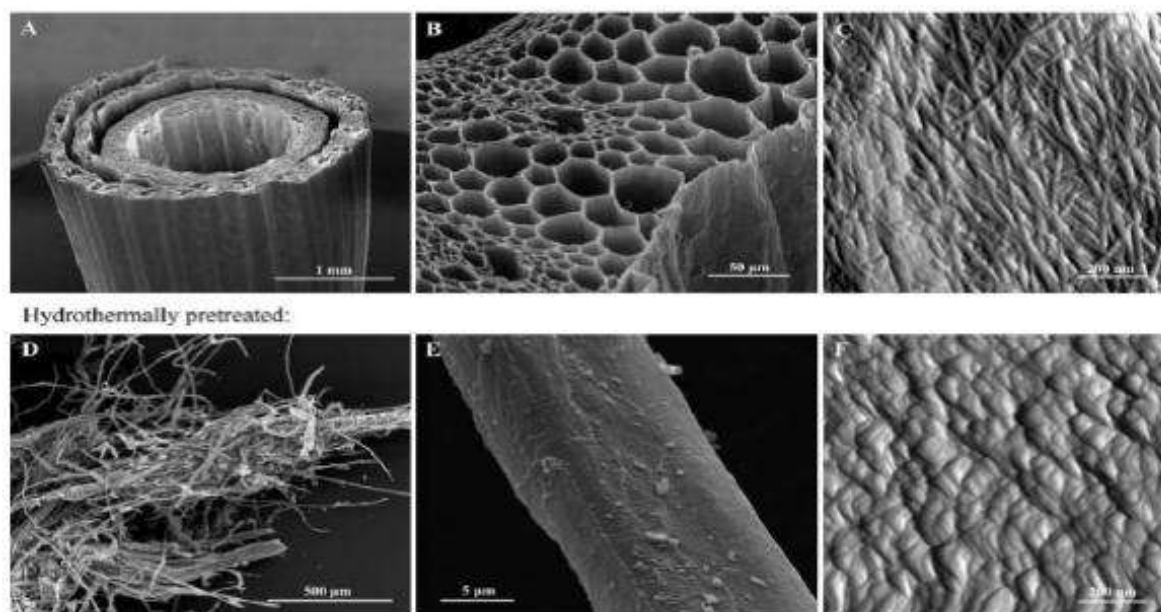


Figura 7. Comparación de la biomasa lignocelulósica sin y con un pretratamiento hidrotérmico.



Los objetivos del pretratamiento generalmente se pueden resumir de la siguiente manera (Xuebing Zhao *et al.*, 2012):

- Eliminar y separar la hemicelulosa de la celulosa.
- Interrumpir y retirar la lignina y/o redistribuir los componentes de la lignina en la pared celular.
- Eliminar el grupo acetilo para eliminar su interferencia con el reconocimiento enzimático de la celulosa.
- Disminuir la cristalinidad y el grado de polimerización de la celulosa.
- Aumentar el área de superficie específica de los sustratos reduciendo el tamaño de las partículas o aumentando la porosidad de los sustratos.
- Aumentar el tamaño de los poros de los sustratos para facilitar la penetración de los agentes de hidrólisis.

Tomando en cuenta los puntos anteriores, la literatura reporta cuatro tipos principales de pretratamientos según la forma de atacar al material lignocelulósico. Estos son: pretratamientos físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos (Cortínez, 2010). En la Figura 8 se presenta la clasificación de los pretratamientos según su naturaleza.



Figura 8. Pretratamientos para materia prima lignocelulósica.



Los pretratamientos fisicoquímicos se caracterizan porque hay una combinación de la acción hidrolítica de radicales ácidos con procesos de descompresión instantánea que provocan la rotura de la estructura del material lignocelulósico (Piñeros, 2016).

El pretratamiento físico más extendido se lleva a cabo sometiendo la biomasa a una corriente de vapor a elevada presión, con temperaturas de entre 160°C y 260°C, provocando la descompresión de la materia y reducción de tamaño, degradando la hemicelulosa, transformando la lignina e incrementando la digestibilidad de la celulosa (Faba *et al.*, 2014).

En cuanto a los pretratamientos químicos, pueden tener naturaleza básica o ácida. Están altamente estudiados como paso previo a la hidrólisis enzimática. Los tratamientos básicos actúan, principalmente en la solubilidad de la lignina, mientras que los ácidos favorecen un fraccionamiento selectivo de la hemicelulosa (Faba *et al.*, 2014).

El pretratamiento biológico se presenta por medio de hongos de la pudrición blanca y blanda que degradan celulosa y lignina y pudrición parda que degradan celulosa. Dichos hongos producen celulasas, hemicelulasas, enzimas que degradan la lignina (ligninasas, lignin-peroxidasas, polifenoloxidasas, lacasas) y enzimas reductoras de quinonas (Piñeros, 2016).

Consecuentemente, además de la buena separación de la fracción deseada, uno de los parámetros más importantes que definirán el proceso aplicado será el bajo costo del catalizador de pretratamiento o su posibilidad de reutilización. En la Tabla 5 se resumen las condiciones de operación y los principales efectos obtenidos con los pretratamientos más utilizados industrialmente (Faba *et al.*, 2014).



Tabla 5. Diferentes condiciones de Operación y efectos de los principales métodos de pretratamiento

	Descripción	Temperatura de Operación (°C)	Tiempo (min)	Efectos	Referencia
AQUASOLV	Tratamiento con Vapor de agua (40MPa)	200	2	Fraccionamiento total de la biomasa sin degradación	Allen et.al.1996
Solvólisis	Tratamiento de agua	200 - 300	15	Fraccionamiento 40-60% de la biomasa. Recuperación total de la hemicelulosa	Mok y Antal, 1992
MASONITE	Descompresión explosiva (Vapor de agua)	210	5	Fracciona 60% de la biomasa, alterando la estructura de la lignina	Mason, 1926
Pretratamientos ácidos	Disoluciones de H ₂ SO ₄ (0.45 -0.85%)	160 - 220	30s – 2 min	Provoca la deshidratación de la hemicelulosa, obteniéndose furfural	Root et al., 1959
AFEX	Expansión a vapor en combinación con base o cal	100 - 200	5 - 30	Separa y altera la estructura de la lignina, pero no elimina toda la hemicelulosa	Bradshaw et al., 2007
ARP	Tratamiento con disolución (5 – 15%) NH ₃	160 - 180	14	Separa principalmente la fracción de lignina	Yoon, et al., 1995

Uno de los métodos industriales más utilizados para el tratamiento previo de la biomasa lignocelulósica es el uso de ácidos diluidos en condiciones de temperatura elevada. Este método se considera relativamente barato y económicamente rentable. Se pueden usar varios ácidos inorgánicos (sulfúrico, clorhídrico, nítrico, fosfórico), sin embargo, el ácido sulfúrico se usa más comúnmente debido a su bajo precio y alta eficiencia en la degradación de las hemicelulosas y otros componentes de la biomasa (Mikulski y Kłosowski, 2018).



Los pretratamientos clásicos implican el uso de soluciones de ácido sulfúrico diluido, usualmente al 5% con rendimientos del 100% a 160 °C, o concentrado, al 77% a más baja temperatura, con lo que se logra por hidrólisis ácida, la formación de azúcares. Con los pretratamientos ácidos, además de la hidrólisis, ocurren reacciones de condensación y eliminación que llevan a la formación sustancias tóxicas para la levadura como el hidroximetilfurfural (Guarnizo *et al* 2009). En términos de formación de furfural, el pretratamiento con ácido sulfúrico proporciona un contenido más bajo que el pretratamiento con ácido fosfórico (Jirakarn *et al.*, 2013).

Así mismo valorando las condiciones de corrosión y de vida útil en los equipos a macroescala para llevar a cabo el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido tenemos que: el acero al carbón puede usarse en ácido sulfúrico concentrado (más del 65%) debido a la formación de una capa de sulfato. Sin embargo, esta capa se erosiona fácilmente, con lo que el uso de acero sólo es aceptable para disoluciones estáticas o con baja velocidad de flujo. Las fundiciones tienen una resistencia parecida al ácido sulfúrico concentrado y además son más resistentes a la erosión. Un incremento en el contenido en carbono o silicio de la fundición suele producir un aumento de la resistencia. Así una fundición con un 14,5% de silicio es resistente al ácido sulfúrico concentrado incluso hasta la temperatura de ebullición (Universidad de Alicante, 2018).

El diagrama de flujo del proceso del sistema de pretratamiento se muestra en la Figura 9. La biomasa se transporta al sistema de pretratamiento desde una tolva de alimentación a través de una cinta de pesaje y una cinta transportadora. El sistema de tratamiento previo continuo consiste en tanques de suministro de ácido; un mezclador de biomasa; Un sistema de reactor de alta presión y alta temperatura y un tanque de flash (Schell *et al.*, 2003).

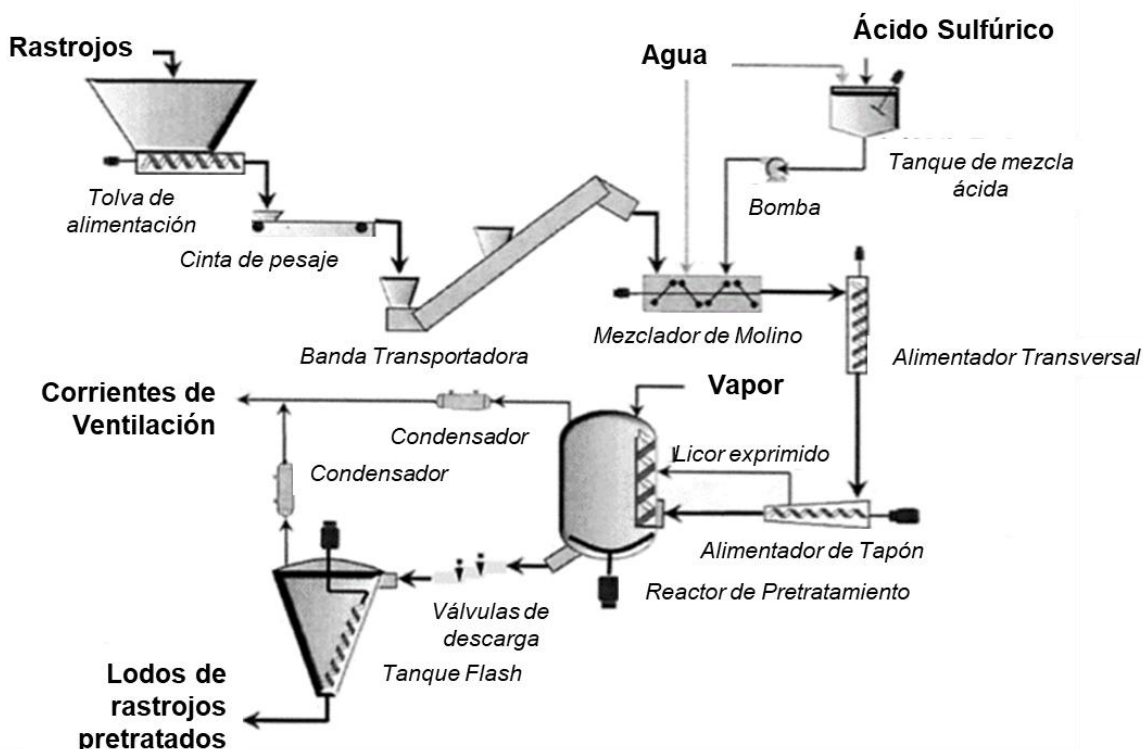


Figura 9. Diagrama del sistema de pretratamiento con H_2SO_4 diluido a escala piloto.

1.2.5 Condiciones de Pretratamiento con Ácido Diluido (Sulfúrico)

El pretratamiento químico con ácido sulfúrico diluido ha sido reportado por sus altas velocidades de reacción y por su efectiva hidrólisis de la celulosa. A una temperatura moderada la sacarificación tiene bajos rendimientos. A altas temperaturas el tratamiento con ácido diluido favorece la hidrólisis de la celulosa y se hidroliza cerca del 80% de la hemicelulosa. La lignina no se solubiliza pero si aumenta los rendimientos de la hidrólisis enzimática.

Está documentado que la producción de altas conversiones de xilano a xilosa hace el proceso económicamente favorable. Existen dos condiciones típicas del pretratamiento con ácido diluido: (1) altas temperaturas (entre 160-200°C), en un proceso continuo con bajas cargas de sólido (5-10% peso sustrato/peso mezcla) o (2) bajas temperaturas (120-160°C), en un proceso con alta carga de sólidos (10-40%). La hidrólisis con ácido diluido ha sido exitosamente probada en el pretratamiento de materiales lignocelulósicos como desechos de maíz, bagazo de caña, madera y



astillas de álamo, paja de trigo y pasto. Ésta utiliza H_2SO_4 , HCl , HNO_3 entre 1-5%. Las variables comúnmente estudiadas son la temperatura, la concentración del ácido y la razón sólido/líquido (Cortínez, 2010).

El pretratamiento con ácidos diluidos puede dar lugar a la formación de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) de la degradación de la glucosa, así como furfural, ácido acético y ácido fórmico de la xilosa. Estos compuestos pueden convertirse además en ácido levulínico y conducir a la repolimerización de furanos y pseudoligninas a partir de derivados fenólicos resultantes de la degradación de las ligninas (Jönsson et al., 2013; Zheng et al., 2013).

El pretratamiento con ácido diluido debe ir precedido por la selección y optimización de las condiciones del proceso, es decir, la temperatura, el tiempo de exposición y la concentración de ácido, para examinar el efecto de los parámetros utilizados en la eficiencia del pretratamiento determinada por la cantidad de glucosa liberada y la eficiencia de la hidrólisis enzimática de celulosa. (Noureddini y Byun, 2010).

Se encontró que para los olotes de maíz la condición óptima para el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido se realiza a 120 °C y una concentración ácida del 2% (p/p) y 5 min de tiempo de reacción. Bajo esta condición fue liberado el azúcar total (pretratamiento + hidrólisis enzimática) alrededor de 47,11 g/l (Jirakarn et al., 2013).

1.2.6 Composición de materiales lignocelulósicos

Los materiales lignocelulósicos están compuestos principalmente de tres tipos diferentes de polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, envueltos en una compleja estructura (Fengel y Wegener, 1984) como lo muestra la estructura química en la Figura 10.

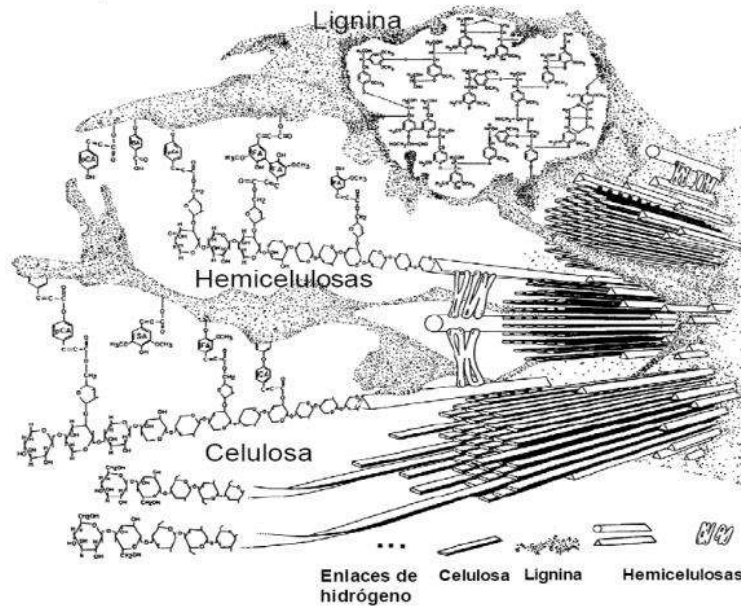


Figura 10. Representación esquemática de la organización de los diferentes biopolímeros de la pared celular de una angiosperma no leñosa.

Este tipo de materiales son los más abundantes en la naturaleza y se encuentran en las proporciones mostradas en la Figura 11.

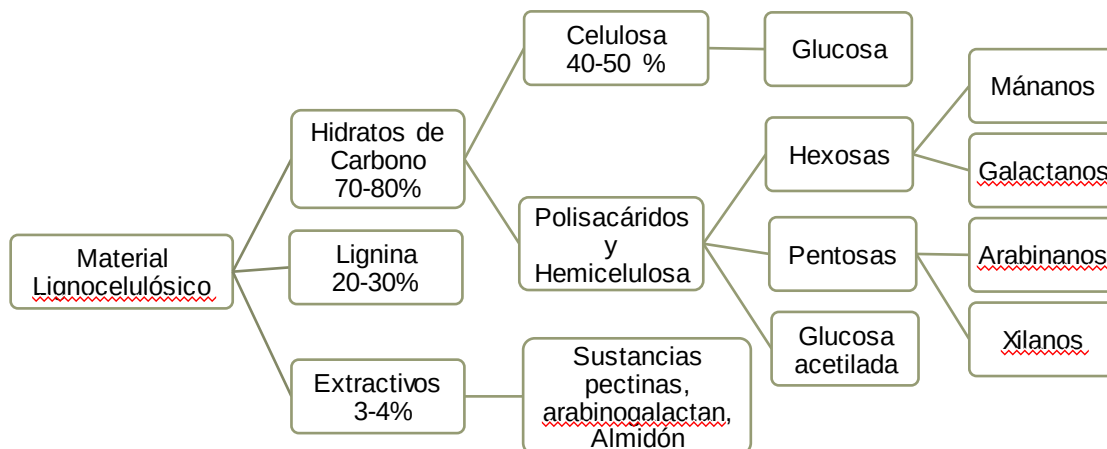


Figura 11. Esquema de composición de materiales lignocelulósicos.



1.2.6.1 Celulosa

Está conformada por subunidades de D-glucosa, unidas por β -1,4 glicosídicos (Fengel y Wegener, 1984), monosacárido de gran importancia en la fermentación. La celulosa posee dos estructuras una cristalina (organizada) y otra amorfa. Las cepas de celulosa son “empaquetados” denominados fibrillas de celulosa. Estas fibrillas de celulosa son en su mayoría independientes y débilmente vinculados a través de uniones de hidrógeno (Sánchez Riaño et al., 2010).

La celulosa tiene una estructura lineal y fibrosa, en la que se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa, lo que hace que sea insoluble en agua (Cortínez, 2010).

1.2.6.2 Hemicelulosa

Carbohidrato complejo y heterogéneo ya que su estructura posee diferentes polímeros como pentosas (como xilosa y arabinosa), hexosas (como manosa, glucosa y galactosa), azúcar y ácidos, entrelazadas entre sí mediante enlaces glicosídicos. Muchas de ellas, en la degradación hidrolítica, dan, junto a glucosa, manosa, galactosa, etc. (Palacio, 1956). La hemicelulosa sirve de conexión entre la lignina y las fibras de celulosa y da toda la rigidez a la red de celulosa, hemicelulosa y lignina (Sánchez Riaño et al., 2010).

1.2.6.3 Lignina

Heteropolímero amorfo que consta de tres diferentes unidades de fenilpropano (*p*-coumaril, coniferil y sinapil alcohol) que se mantienen unidos por diferentes enlaces. El heteropolímero amorfo no es soluble en agua y ópticamente inactivo; todo esto hace que la degradación de la lignina sea muy complicada (Sánchez Riaño et al., 2010).



1.2.7 Antecedentes del Pretratamiento de Rastrojo de Trigo

Anteriormente se evaluó con 7.83% (p/v, DS) de paja de trigo, una dosis ácida de 0.75% (v/v) el cual dio un rendimiento máximo (485 ± 22 mg/g, 64% de carbohidratos totales) de azúcares fermentables. Alrededor del 92% de la hemicelulosa se convirtió en azúcares (255 ± 13 mg / g de DS) y solo el 47% de celulosa (230 ± 9 mg / g de DS) se convirtió en glucosa. No se encontraron cantidades detectables ($>0,001\%$, p/v) de furfural e HMF en estos hidrolizados. También se estudió el efecto del aumento de la dosis de H_2SO_4 (hasta 4%, v/v) en el pretratamiento y la sacarificación enzimática de la paja de trigo. Los resultados pueden observarse en la Figura 12 (Saha et al., 2005).

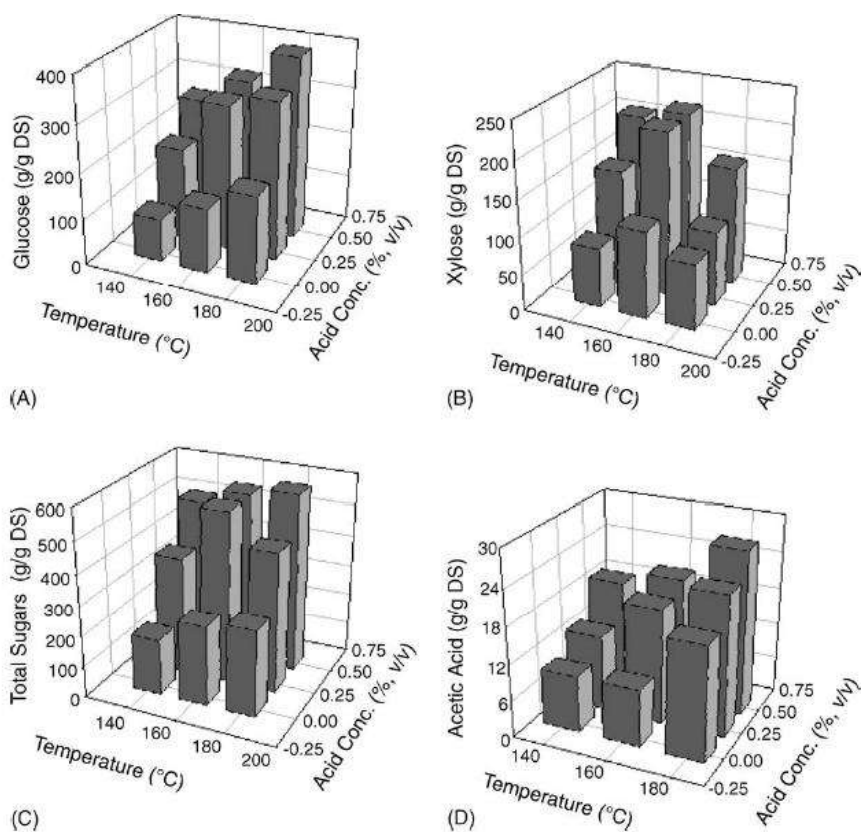


Figura 12. Efecto de la temperatura (140,160 y 180°C) y de la dosis de ácido (0,0, 0,25 y 0,5%, v/v) sobre la liberación de glucosa (A), xilosa (B), azúcares totales (C) y ácido acético (D) mediante pretratamiento con ácido diluido durante 15 minutos y sacarificación enzimática (45°C, pH 5,0, 72h).



1.2.8 Antecedentes del Pretratamiento de Rastrojo de Maíz:

Un estudio paramétrico realizado, con una carga inicial de 15% p/p de rastrojo seco de maíz blanco, evaluó la hidrólisis termoquímica secuencial, la sacarificación enzimática y la fermentación. La termoquímica secuencial fue diseñada para liberar la cantidad máxima de xilosa con una formación concomitante de cantidades mínimas de furanos. Se encontró que el 29,0% o el 93,2% del xilano se recuperó como xilosa libre a 130°C después de 8 minutos en presencia de 1% o 2% p/p de H_2SO_4 y produjo solo 0,06 o 0,44 g/l de furanos totales respectivamente. Los resultados pueden observarse en la Figura 13 (Vargas-Tah et al., 2015).

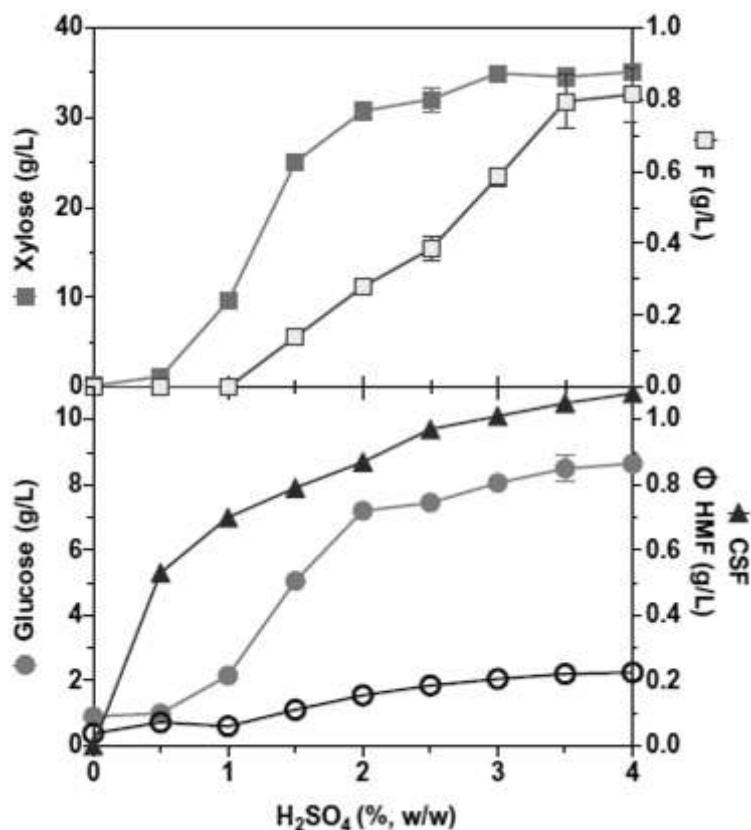


Figura. 13. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la liberación de xilosa y glucosa de rastrojo de maíz blanco y en formación de furano. El rastrojo de maíz blanco fue pretratado a 130 C durante 8 min con La concentración de ácido sulfúrico indicada en la parcela. El factor de gravedad combinado (LCR) para mostrar su relación con la concentración de ácido sulfúrico. Los experimentos se realizaron en autoclave con botellas de 100 ml.



1.2.9 Antecedentes del Pretratamiento de Paja de Sorgo Dulce:

Se realizó una investigación sobre la liberación de azúcares totales fermentables (TS) y la formación de compuestos de degradación total (TDC) por hidrólisis diluida con ácido sulfúrico del bagazo de sorgo dulce del genotipo SSV 84. La hidrólisis se realizó a temperaturas moderadas (100 °C y 121 °C). Se examinó el efecto de la severidad del tratamiento previo (medido por el factor de severidad combinado, el tamaño de las partículas y la carga del sustrato en la composición de hidrolizado. El máximo rendimiento teórico de pentosas (C5) es de 29.9 g C5/100 g bagazo en peso seco. Bajo las condiciones de este estudio, un 10% de carga de sustrato en el rango CS de 1.64–1.93 fue óptimo con un rendimiento de C5 > 22.3g/100 g de bagazo y eficiencia (relación azúcares fermentables totales/compuestos de degradación total) > 8. La reducción del tamaño de partícula de bagazo también resultó en una mayor eficiencia. Este estudio mostrado en la Figura 14 demuestra que la hidrólisis ácida a temperatura moderada tiene una ventaja en términos de alta concentración de azúcares en comparación con la formación de compuestos de baja degradación. (Banerji *et al.*, 2013)

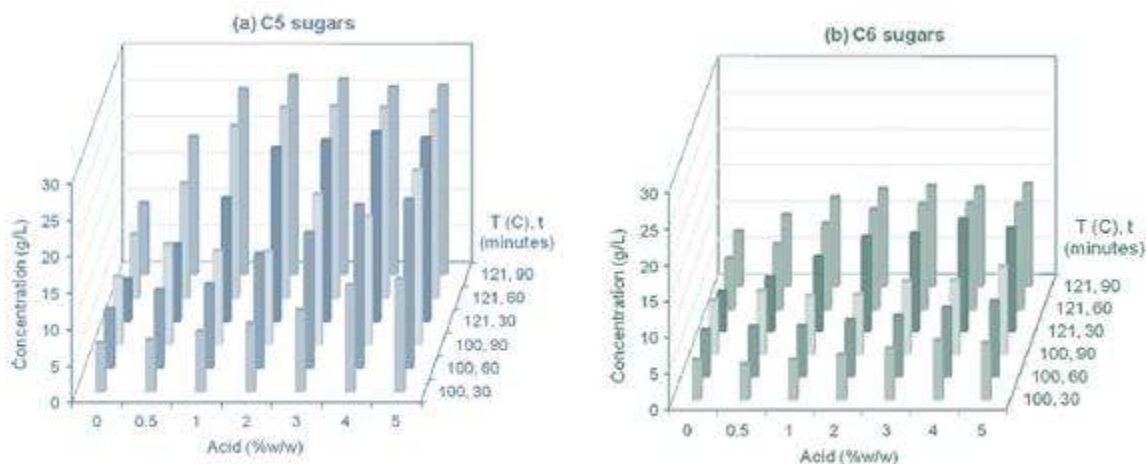


Figura 14. Azúcares liberados a diferentes concentraciones de ácido, tiempo de reacción (t) y temperatura (T) (fracción L 10% p/p) a) azúcares C5 b) azúcares C6 para el bagazo de sorgo dulce



Capítulo 2. Planteamiento del problema

Actualmente se sabe que no es posible abastecer la demanda con un solo material lignocelulósico para cubrir el consumo energético o para la generación de productos de valor agregado.

2.1 Justificación

Se han realizado estudios del pretratamiento con ácido diluido de cada uno de los materiales lignocelulósicos, sin embargo, no hay información sobre el uso de mezclas de materiales con las cuales sea posible cubrir la demanda para la producción de bioproductos en cualquier temporada del año.

2.2 Hipótesis

Como resultado del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido se obtendrá el mayor rendimiento posible de xilosa y arabinosa, y bajas concentraciones de ácido acético e HMF para las diferentes mezclas compuestas con diferentes proporciones de rastrojo de maíz, paja de trigo y paja de sorgo dulce.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo General

Estudiar el efecto de diferentes porcentajes de materiales lignocelulósicos (paja de trigo, rastrojo de maíz, paja de sorgo) y el tiempo de hidrólisis, en la recuperación de azúcares estructurales de estos materiales.



2.3.2 Objetivos Particulares:

- Caracterización cada material por separado
- Hidrólisis ácida de cada material por separado
- Realizar un diseño experimental que nos permita evaluar el rendimiento de la variación en las proporciones de los ingredientes para cualquier combinación de mezclas posibles, a 130°C y una concentración del 2% de H_2SO_4 .



Capítulo 3. Metodología

3.1 Proceso de Investigación

En la primera etapa se realizó una revisión bibliográfica de los conceptos de biomasa, pretratamiento, carbohidratos, composición química de los materiales, así como la comparación de los diferentes métodos de pretratamiento, condiciones de pretratamiento ácido, diseño experimental de mezclas, caracterización y cuantificación de materiales lignocelulósicos. Posteriormente se evaluó la metodología experimental con el que se podrá cuantificar los resultados del diseño.

3.1.1 Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC)

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de su popularidad son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para automatizarla, su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles, pero sobre todo, su amplia aplicabilidad a sustancias que son importantes en la industria, muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales son aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y una variedad de sustancias inorgánicas (Douglas, 2008).

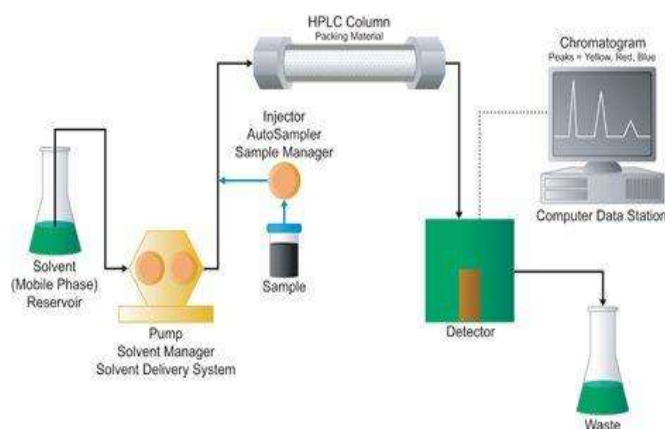


Figura 15. Diagrama de cromatografía de líquidos de alta eficiencia HPLC.



Pocas técnicas pueden conjugar su versatilidad y precisión. Esta técnica es automatizada, tiene detectores altamente sensibles y selectivos que extienden los límites de detección a niveles de nanogramos, picogramos, e incluso femtogramos. Como una técnica preparativa, proporciona una recuperación cuantitativa de muchos compuestos lábiles en cantidades que van desde los miligramos hasta kilogramos. La cromatografía de líquidos de alta eficiencia está disponible para un 60-80% de los compuestos existentes, comparada con el 15% de compuestos que se puede analizar por cromatografía de gases (Snyder & Kirkland, 1997).

Con el objetivo de alcanzar flujos razonables con rellenos de tamaño de partícula de entre 3 y 10 μm , que por otra parte son comunes en la cromatografía de líquidos moderna, se requieren presiones de bombeo de varios cientos de atmósferas. Debido a estas presiones elevadas, el equipo necesario para la cromatografía de líquidos de alta resolución tiende a ser más complejo y caro que el que se utiliza en otros tipos de cromatografía. En la Figura 16 se muestra un esquema de los componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos característico.

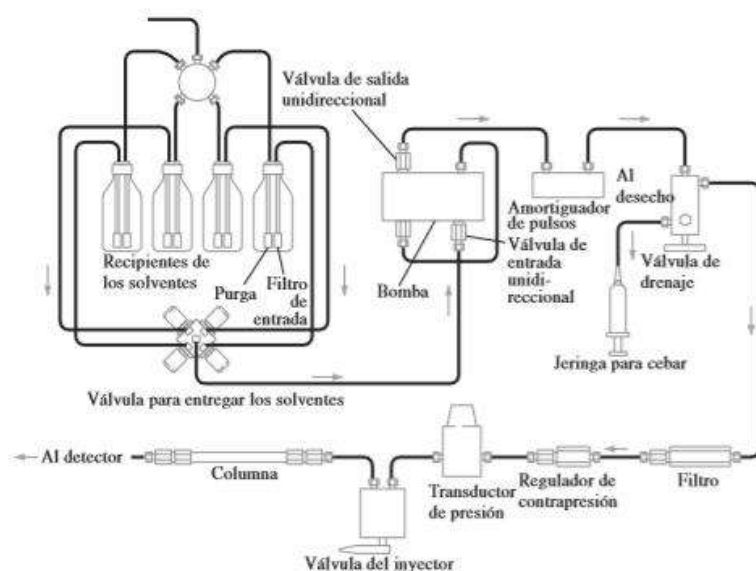


Figura 16. Diagrama de bloques que muestra los componentes de un aparato característico de CLAR. (Cortesía de Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT).



3.2 Diseño Experimental

3.2.1 Metodología

La figura 17 muestra un esquema de la metodología seguida durante el experimento:

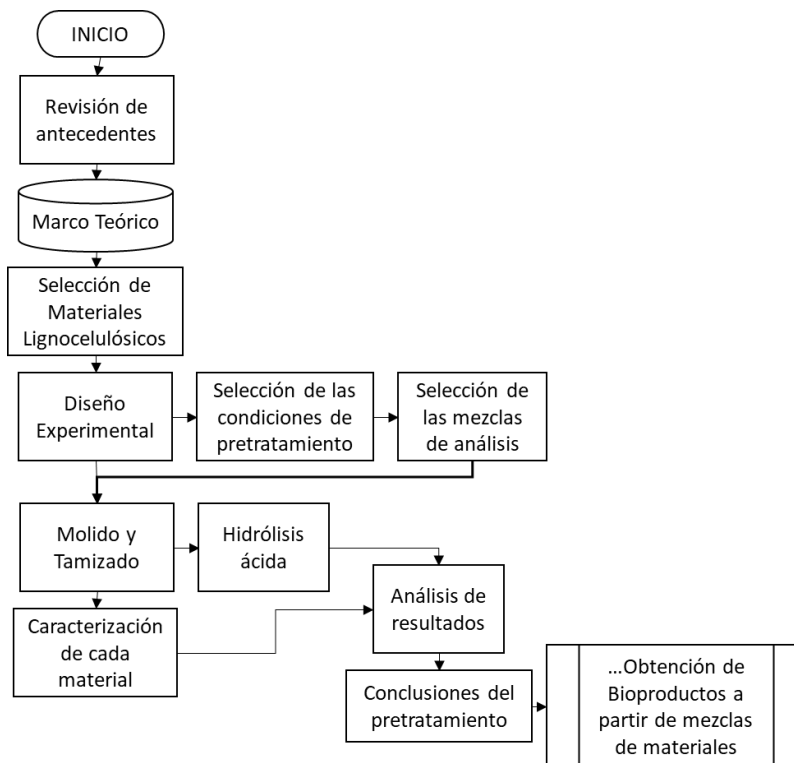


Figura 17. Metodología

3.2.1.1 Análisis Estadístico

Para conseguir las combinaciones de los tratamientos, se utilizó un Diseño Simplex con Centroide Ampliado que corresponde a un diseño de mezclas de tres componentes (Kuehl 2001). Para el desarrollo del análisis se utilizó el software estadístico Statistica 10. El diseño se observa en la Figura 18 que corresponde a un diagrama donde se representa todo el universo de posibilidades de mezclas de los tres materiales lignocelulósicos (Loubes *et al.*, 2016), cada punto tiene tres valores que representan las fracciones másicas de cada material lignocelulósico.

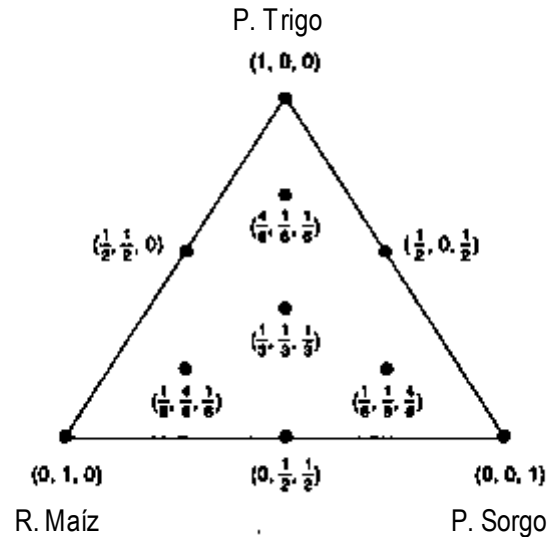


Figura 18. Puntos aumentados de las fracciones másicas consideradas para el diseño de mezcla de los efectos de paja de trigo, rastrojo de maíz y paja de sorgo dulce.

En general, se desea ajustar un modelo a los datos que explique suficientemente el patrón de mediciones para la variable dependiente. Para el conjunto de datos actual, diseñamos el estudio para un modelo polinómico de grado 2, es decir, el modelo de máxima complejidad que se puede ajustar es el modelo cuadrático. En su forma canónica se puede expresar como en la siguiente ecuación:

Ecuación 0. Ecuación de diseño Simplex con Centroide Ampliado para 3 variables de mezcla

$$Y_{pred} = b_1 * X_1 + b_2 * X_2 + b_3 * X_3 + b_{12} * X_1 * X_2 + b_{13} * X_1 * X_3 + b_{23} * X_2 * X_3$$

Aquí b_i representa los coeficientes y x_i los valores de los factores.



3.3 Análisis y procedimientos

Se caracterizaron los tres materiales empleados en este análisis por separado, el rastrojo de maíz y rastrojo de trigo se obtuvieron en una forrajera ubicada en la ciudad de Morelia, Michoacán con origen y tiempo de antigüedad desconocidos. El rastrojo de sorgo dulce es proveniente de Monterrey, Nuevo León y fue previamente secado al sol.

3.3.1 Molido y Tamizado

Inicialmente se prepararon las muestras de material lignocelulósico moliendo cada rastrojo por separado, como se muestra en la Figura 19:



Figura 19. Molido y tamizado de los materiales a) Molido b) Malla de tamizado c) Tamizador

Para el tamizado se utilizó un Equipo Ro Tap con números de malla 6 - 60 con agitaciones de 2 min 30 segundos por batch. Se separó el material retenido en las mallas 60, utilizado posteriormente para la caracterización, y malla 40 utilizado para las hidrólisis.

3.3.2 Determinación de Sólidos Totales

Las muestras de biomasa pueden contener cantidades grandes y variables de humedad, que pueden cambiar rápidamente cuando se expone al aire. Para ser significativos, los resultados de



los análisis químicos de la biomasa, por lo general, se reportan sobre una base de peso seco. El procedimiento utilizado para determinar la cantidad de sólidos o Humedad presente en una muestra de biomasa sólida o en suspensión es un procedimiento tradicional de secado por horno de convección cubierto. (A. Sluiter *et al.*, 2008).

Procedimiento de determinación de sólidos totales:

Método de horno de convección

Equipo: Horno de Secado (ver Figura 21)

Marca: Novatech

Modelo: HS35-A

Serie: 056170 120 VOLTS 5 AMP



Figura 20. Horno de secado

Se pesaron previamente las charolas. Se secaron las charolas de pesaje de aluminio colocándolos en un horno de secado de $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Se enfriaron las charolas en un desecador usando pinzas para manipular las charolas, se pesó cada charola previamente secado con una precisión de 0.1 mg.

Se mezcló completamente la muestra y luego se pesaron 500 mg con una precisión de 0.1mg, en la charola. Se registró el peso de la muestra, más charola de pesaje. Se analizó cada muestra por triplicado.

Se colocó la muestra en un horno de convección a $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Se retiró la muestra del horno y se enfrió a temperatura ambiente en un desecador. Se pesaron las



charolas que contenían la muestra secada al horno con una precisión de 0.1 mg y se registraron estos pesos.

Cálculos de sólidos totales

Ecuación 1. Determinación del porcentaje de sólidos totales en una base de peso seco de 105°C:

$$\%Sólidos\ Totales = \frac{(Peso\ charola\ seca\ más\ muestra\ seca - Peso\ charola\ seca)}{Peso\ muestra\ sin\ secar} \times 100 \quad (Ecuación\ 1)$$

Ecuación 2. Porcentaje de humedad es igual a:

$$\%Humedad = 100\% - \%Sólidos\ Totales \quad (Ecuación\ 2)$$

3.3.3 Determinación de cenizas en biomasa

La cantidad de material inorgánico en la biomasa, ya sea estructural o extraíble, debe medirse como parte de la composición total. La ceniza estructural es un material inorgánico que está unido a la estructura física de la biomasa, mientras que la ceniza extraíble es un material inorgánico que se puede eliminar lavando o extrayendo el material. La ceniza extraíble puede ser el resultado de que el suelo permanezca en la biomasa. Este procedimiento es sustancialmente similar al Número de Método Estándar ASTM E1755-01 "Método Estándar para la Determinación de Ceniza en Biomasa". Este método de prueba cubre la determinación de ceniza, expresada como el porcentaje de residuo que queda después de la oxidación seca a 550 a 600°C. Todos los resultados se informan en relación con el peso seco de la muestra a 105°C (A. Sluiter *et al.*, 2008).



Procedimiento

Método con Mufla

Equipo: Mufla

Marca: Felisa

Modelo: FE-340

Serie: 1609026 120 VOLTS 1500W



Figura 21. Mufla

Se identificaron los crisoles y se colocaron en el horno de mufla a $575 \pm 25^\circ \text{C}$ durante 24 horas. Se retiraron los crisoles del horno directamente en un desecador, enfriando previamente en la mufla durante dos horas. Se pesaron los crisoles con una precisión de 0,1 mg y se registraron estos pesos.

Se volvió a colocar la muestra en el horno de mufla a $575 \pm 25^\circ \text{C}$ y fue secado a peso constante. El peso constante se define como un cambio en el peso inferior a $\pm 0,3$ mg después de una hora de recalentamiento del crisol.

Se pesaron 0,3 g de muestra, con una precisión de 0,1 mg, en el crisol tarado. Anotando el peso de la muestra. Se utilizaron muestras secas al aire, al mismo tiempo se realizó la "Determinación de sólidos totales en la biomasa", para medir con precisión el porcentaje de sólidos a corregir. Cada muestra se analizó por triplicado.

Se calcinaron las muestras a cenizas usando un horno de mufla ajustado a $575 \pm 25^\circ \text{C}$. Colocando los crisoles en el horno de mufla a $575 \pm 25^\circ \text{C}$ durante 24 ± 6 horas.



Se sacaron cuidadosamente cada crisol del horno directamente a un desecador y se enfriaron durante un tiempo determinado, igual al tiempo de enfriamiento inicial de los crisoles. Se pesaron los crisoles y las cenizas con una precisión de 0,1 mg y se registraron.

Se volvió a colocar la muestra en el horno de mufla a $575 \pm 25^\circ\text{C}$ realizando cenizas hasta peso constante. El peso constante se define como un cambio de menos de ± 0.3 mg en el peso después de una hora de recalentamiento del crisol. Al permitir que las muestras se enfríen en un desecador, es necesario mantener el tiempo de enfriamiento inicial.

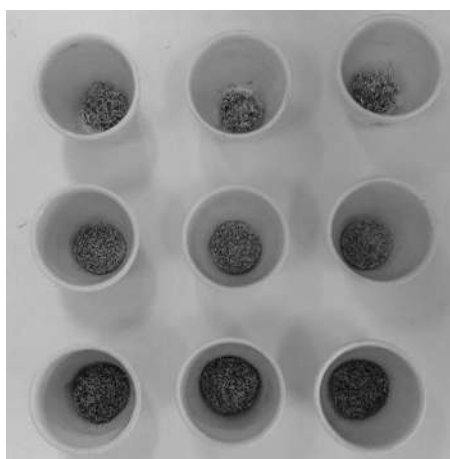


Figura 22. Producto de cenizas de los materiales

Cálculos para determinación de cenizas

Se usó una muestra seca al aire, el peso seco en horno (ODW) de la muestra se calculó utilizando el contenido promedio total de sólidos según lo determina el “Método estándar para la determinación de sólidos totales en biomasa” de LAP.

Ecuación 3. Determinación de peso seco en horno (ODW)

$$ODW = \frac{(\text{Peso muestra seca al aire} \times \% \text{ Sólidos Totales})}{100}$$

(Ecuación 3)



Ecuación 4. Porcentaje de cenizas en una base ODW

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(\text{Peso crisol más ceniza} - \text{Peso crisol})}{\text{ODW}_{\text{muestra}}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

3.3.4 Determinación de carbohidratos estructurales y lignina en biomasa

Los carbohidratos y la lignina constituyen una parte importante de las muestras de biomasa. Estos constituyentes deben medirse como parte de un análisis exhaustivo de la biomasa. Los carbohidratos pueden ser estructurales o no estructurales. Los carbohidratos estructurales están unidos a la matriz de la biomasa, mientras que los carbohidratos no estructurales se pueden eliminar mediante la extracción o los pasos de lavado. La lignina es un polímero fenólico complejo. Partes de este procedimiento son sustancialmente similares a ASTM E1758-01 "Método estándar para la determinación de carbohidratos por HPLC". Este procedimiento es adecuado para muestras que no contienen extractos. Este procedimiento utiliza una hidrólisis ácida de dos pasos para fraccionar la biomasa en formas que se cuantifican más fácilmente. La lignina se fracciona en material insoluble en ácido y material soluble en ácido. El material insoluble en el ácido también puede incluir cenizas y proteínas, que se deben tener en cuenta durante el análisis gravimétrico. La lignina soluble en ácido se mide por espectroscopia UV-Vis. Durante la hidrólisis, los carbohidratos poliméricos se hidrolizan en sus correspondientes formas monoméricas, que son solubles en el líquido de hidrólisis. Luego se miden por HPLC. La proteína también puede dividirse en la fracción líquida. Es necesaria una medida del contenido de acetilo para la biomasa que contiene hemicelulosa con un esqueleto de xilano, pero que no contiene esqueleto de manano. El acetato se mide por HPLC (Sluiter *et al.*, 2018).

Procedimiento

Descripciones de equipo: Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC)



Marca VARIAN Pro Star modelo SDM 230

UV Marca VARIAN Pro Star model 325

Detector IR Marca VARIAN Pro Star model 350



Figura 23. Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia HPLC

Para la caracterización de los materiales se prepararon las muestras tamiz 60 para el análisis y se hidrolizaron:

Se pesaron 300.0 ± 10.0 mg de cada muestra en un tubo de presión tarado. Se registraron los pesos con una precisión de 0.1 mg. La "Determinación de sólidos totales en biomasa" se realizó al mismo tiempo para medir con precisión el porcentaje de sólidos para la corrección. Cada muestra se analizó por triplicado.



Figura 24. Muestras de materiales lignocelulósicos



A estas muestras pesadas en los tubos de presión se agregaron 3.00 ± 0.01 mL (o 4.92 ± 0.01 g) de ácido sulfúrico al 72%. Agitando con una varilla de vidrio para mezclar durante un minuto, hasta que la muestra se mezcló bien.

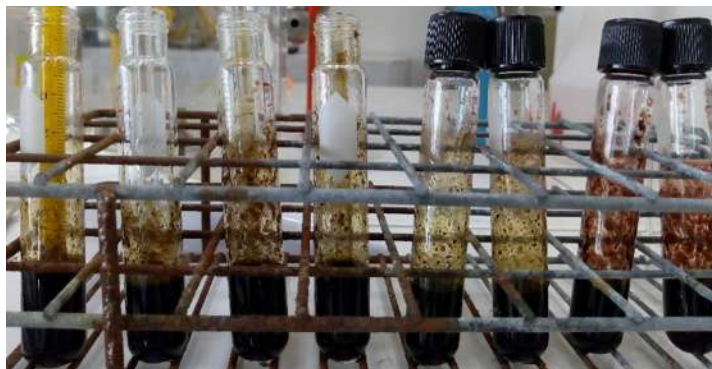


Figura 25. Caracterización etapa 1

Se colocaron los tubos de presión en un baño de agua a 30 ± 3 ° C e incubaron durante 60 ± 5 minutos. Usando la varilla de agitación, se agitó la muestra cada 5 a 10 minutos sin quitar la muestra del baño para mejorar la hidrólisis de material.



Figura 26. Caracterización etapa 2

Al completar la hidrólisis de 60 minutos, se retiraron los tubos del baño de agua. Se diluyó el ácido a una concentración del 4% agregando poco a poco el material dentro de los frascos con 84.00 ± 0.04 g de agua desionizada pesada en báscula analítica con un equilibrio exacto a 0.01 g.



Se atornillaron de forma segura las tapas de teflón de los frascos Scott de 250 ml. El mezclado se realizó invirtiendo el tubo varias veces para eliminar la separación de fases entre altos y capas ácidas de baja concentración.



Figura 27. Preparación de la hidrólisis para la caracterización

Nota: El volumen de la solución al 4% es de 86.73 mL, como se demuestra siguiendo los cálculos:

Densidad al 72% de H_2SO_4 = $d_{72\% \text{ H}_2\text{SO}_4}$ = 1.6338 g / mL

Densidad del H_2O = $d_{\text{H}_2\text{O}}$ = 1.00 g / mL

Densidad al 4% de H_2SO_4 = $d_{4\% \text{ H}_2\text{SO}_4}$ = 1.025 g / mL

El peso de 3.00 mL al 72% de H_2SO_4 es:

$$3.00 \text{ mL } 72\% \text{ H}_2\text{SO}_4 \times d_{72\% \text{ H}_2\text{SO}_4} = 4.90 \text{ g } 72\% \text{ H}_2\text{SO}_4$$

La composición de 3 ml de H_2SO_4 al 72% es:

$$4.90 \text{ g } 72\% \text{ H}_2\text{SO}_4 \times 72\% (\text{peso ácido}) = 3.53 \text{ g de ácido}$$

$$4.90 \text{ g } 72\% \text{ de } \text{H}_2\text{SO}_4 \times 28\% (\text{peso del agua}) = 1.37 \text{ g de agua}$$

La concentración de H_2SO_4 después de la dilución es:

$$3.53 \text{ g de ácido} / (84.00 \text{ g H}_2\text{O} + 4.90 \text{ g } 72\% \text{ H}_2\text{SO}_4) = 3.97\% \text{ H}_2\text{SO}_4 (\text{p/p})$$

El volumen total de solución presente después de la dilución es:

$$(4.90 \text{ g } 72\% \text{ H}_2\text{SO}_4 + 84.00 \text{ g H}_2\text{O}) \times (d_{4\% \text{ H}_2\text{SO}_4})^{-1} = 86.73 \text{ mL}$$



Se introdujeron las muestras selladas a la autoclave durante una hora a 130°C. Después de completar el ciclo de autoclave, se dejó que los hidrolizados se enfriaran lentamente a temperatura ambiente antes de retirar las tapas.

Análisis de lignina insoluble en ácido.

Después de enfriarse, las soluciones de hidrólisis autoclaveadas fueron filtradas al vacío utilizando papel filtro Whatman, como se observa en la Figura 28.



Figura 28. Filtrado de hidrolizados

Se transfirió una alícuota de aproximadamente 50 ml, a un frasco de almacenamiento de muestras. Esta muestra se utilizó para determinar la lignina soluble en ácido, los carbohidratos, y el acetato. Posteriormente utilizando agua desionizada, para transferir cuantitativamente todos los sólidos restantes fuera de la presión tubo en el crisol filtrante, se enjuagaron los sólidos con un aproximado de 50 ml.

Se secaron cada papel filtro en conjunto con el residuo insoluble en ácido dentro de horno de secado a 105 ± 3 °C hasta que se obtuvo un peso constante, durante 12 horas. Este paso se observa en la Figura 29.



Figura 29. Evidencia de lignina insoluble de los hidrolizados

Se retiraron las muestras del homo y enfriaron en un desecador. Registrando el peso residuo seco con una precisión de 0.1 mg.

3.3.4.1 *Análisis de lignina soluble en ácido.*

Utilizando un espectrofotómetro UV-Visible, se preparó un blanco de agua desionizada y ácido sulfúrico al 4%.

Usando la alícuota de licor de hidrólisis obtenida en el paso de filtrado, se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda apropiada en un espectrofotómetro UV-Visible. La Tabla 6 muestra los valores de longitud de onda sugeridos para estas muestras. La muestra se diluyó 1:2 para que la absorbancia resultara en el rango de 0.7-1.0, registrando la dilución y resultados. Se utilizó agua desionizada como blanco y diluyente.

3.3.4.2 *Análisis la muestra de carbohidratos estructurales.*

Se prepararon una serie de estándares de calibración que contengan los compuestos que se van a utilizar cuantificado. Los cuales se muestran en la Tabla 6a.

Tabla 6a. Concentraciones en mg/mL de los estándares de calibración del cromatógrafo

Compuesto	STD 0	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5	STD 6
Glucosa	0	1.5	3	9	15	24	30
Xilosa	0	1.5	3	9	15	24	30
Arabinosa	0	0.25	0.5	1.5	2.5	4	5



Ac. Acético	0	0.5	1	3	5	8	10
Furfural	0	0.15	0.3	0.9	1.5	2.4	3
HMF	0	0.15	0.3	0.9	1.5	2.4	3

Los estándares fueron filtrados con filtros de nylon de 0.2 μm en viales, sellados y etiquetados.

La mezcla obtenida de la hidrólisis termoquímica fue exprimida para separar el licor (jugo) del bagazo. En éste procedimiento se recuperaron alícuotas de 20 ml de cada experimento en un tubo de ensaye para su posterior análisis.

Se utilizó carbonato de calcio para neutralizar 3 mL de muestra hasta llegar a un pH entre 5 y 6. La adición del carbonato se realizó poco a poco, agitando en vortex cada vez que se agregaba el carbonato. Después de alcanzar pH 5-6, se dejó de agregar el carbonato de calcio. Posteriormente la muestra se centrifugó para separar la fase líquida del carbonato residual. El pH del líquido después de separarse deberá ser inferior a 7.

Se prepararon las muestras de hidrólisis para el análisis en HPLC pasando el líquido decantado a través de un 0.2 μm filtrar en un vial para cromatografía. Sellando e identificando cada vial.

Se analizaron los estándares de calibración, y muestras de hidrólisis por HPLC usando columna REZEX ROA-Organic Acid H+ 300 x 7.80 mm micron equipada con la protección adecuada columna.

Condiciones de HPLC:

Volumen de inyección: 20 μL , dependiendo de la concentración y los límites del detector

Fase móvil: agua de grado HPLC, 0.2 μm filtrada y desgasificada, ácido fosfórico H_3PO_4 0.05mN

Velocidad de flujo: 0.6 mL / minuto



Temperatura de la columna: 60 ° C

Temperatura del detector: IR 45°C

Detector: índice de refracción

Tiempo de ejecución: 50 minutos

Cálculos para determinación de lignina y carbohidratos estructurales:

Ecuación 5. Porcentaje en peso de residuo insoluble en ácido (AIR)

$$\%AIR = \frac{(Peso_{crisol\ más\ ceniza} - Peso_{ceniza})}{ODW_{muestra}} \times 100 \quad (Ecuación\ 5)$$

Ecuación 6. Porcentaje de lignina insoluble en ácido (AIL) sobre una base libre de extractos.

$$\%AIL = \frac{(Peso_{crisol\ más\ dre} - Peso_{crisol}) - (Peso_{crisol\ más\ ceniza} - Peso_{crisol}) - Peso_{proteína}}{ODW_{muestra}} \times 100 \quad (Ecuación\ 6)$$

Donde:

Peso de la proteína = Cantidad de proteína presente en el residuo insoluble en el ácido, según se determina en la "Determinación del contenido de proteína en la biomasa" de LAP. Esta medida solo es necesaria para la biomasa que contiene altas cantidades de proteína. Nuestros estudios han demostrado que, para una materia prima de rastrojo de maíz, solo una pequeña fracción de la proteína se condensa en el residuo. Para un rastrojo de maíz pretratado, una cantidad significativa del material nitrogenado se condensa en el AIRE. Se puede determinar la cantidad de nitrógeno en el residuo. Si se determina un valor de nitrógeno, el usuario debe tener en cuenta que el factor de nitrógeno a proteína ya no será válido, ya que es probable que el material nitrogenado se haya degradado.

Ecuación 7. Cantidad de lignina soluble en ácido (ASL) en forma libre.

$$\%ASL = \frac{UVabs \times Volumen_{filtrado} \times Dilución}{\epsilon \times ODW_{muestra} \times Longitud\ de\ celda} \times 100 \quad (Ecuación\ 7)$$

Donde:



UV_{abs} = absorbancia promedio de UV-Vis para la muestra a la longitud de onda apropiada (vea la tabla a continuación)

Licor de hidrólisis de volumen = volumen de filtrado, 86.73 ml

Ecuación 8. Cálculo de dilución

$$Dilución = \frac{Volumen_{muestra} \times Volumen_{solvente de dilución}}{Volumen_{muestra}} \times 100 \quad (Ecuación 8)$$

ϵ = Absorción de la biomasa a una longitud de onda específica (ver Tabla 6 a continuación)

$ODW_{muestra}$ = peso de la muestra en miligramos

Longitud de celda = longitud de la celda de UV-Vis en cm

Tabla 6. Constantes de absortividad para la medición de lignina soluble en ácido para determinados tipos de biomasa

Tipo de Biomasa	Lambda max. (nm)	Absortividad a lambda max (L/g cm)	Longitud de onda recomendada (nm)	Absortividad a la longitud de onda recomendada (L/g cm)
<i>Pinus radiata</i> NIST SRM 8493	198	25	240	12
Bagazo NIST SRM 8491	198	40	240	25
Rastrojo de maíz NREL materia prima suministrada	198	55	320	30
<i>Populus deltoides</i> NIST SRM 8492	197	60	240	25



Nota: los valores de Lambda max a menudo contienen picos interferentes de productos de degradación de carbohidratos. Los valores de longitud de onda recomendados se han elegido para minimizar estas interferencias.

Ecuación 9. Cantidad total de lignina libre.

$$\%Lignina_{libre\ de\ extractos} = \%AIL + \%ASL \quad (Ecuación\ 9)$$

Con una curva de calibración para cada analito se cuantificó, mediante regresión lineal, y determinó la concentración en mg/ml de cada componente presente en las muestras analizadas por HPLC, corrigiendo la dilución si es necesario.

Ecuación 10. Cantidad de cada estándar de verificación de calibración recuperado después del análisis de HPLC.

$$\%CVS_{recuperado} = \frac{conc.detectada\ por\ HPLC, mg/mL}{conc.conocida\ de\ estándar, mg/mL} \times 100 \quad (Ecuación\ 10)$$

Ecuación 11. Concentración de los azúcares poliméricos a partir de la concentración de los azúcares monoméricos correspondientes, utilizando una corrección anhidro de 0,88 o (132/150) para los azúcares C-5 (xilosa y arabinosa) y una corrección de 0,90 o (162 / 180) para Azúcares C-6 (glucosa, galactosa y manosa).

$$C_{anhidro} = C_{corr} \times Corrección\ anhidro \quad (Ecuación\ 11)$$

Ecuación 12. Porcentaje de cada azúcar libre.



$$\%Azúcar_{libre\ de\ extractos} = \frac{C_{anhidro} \times V_{filtrado} \times \frac{1g}{1000mg}}{ODW_{muestra}} \times 100 \quad (Ecuación\ 12)$$

Donde:

$V_{filtrado}$ = volumen de filtrado, 86.73 mL

Ecuación 13. Porcentaje de acetato libre.

$$\%Acetato_{libre\ de\ extractos} = \frac{C_{AA, HPLC} \times Volumen_{filtrado} \times Factor\ de\ conversión}{ODW_{muestra}} \times 100 \quad (Ecuación\ 13)$$

Dónde: CAA, HPLC = concentración en mg / ml de ácido acético según lo determinado por HPLC Volumen de hidrólisis por volumen = volumen de filtrado, generalmente 86.73 ml
Factor de conversión = (59/60) = 0.983, la conversión de ácido acético a acetato en biomasa

Nota (8 de julio de 2011): El factor de conversión se ha actualizado de versiones anteriores del LAP. El valor anterior fue (43/60) = 0.717.

Ecuación 14. Diferencia porcentual relativa (RPD) entre dos muestras, use el siguiente cálculo.

$$RPD = \left(\frac{X_1 - X_2}{X_{media}} \right) \times 100 \quad (Ecuación\ 14)$$

Dónde:

X_1 y X_2 = valores medidos

X_{media} = la media de X_1 y X_2



Ecuación 15. Raíz cuadrada media (RMS) de la muestra usando:

$$RMS = X_m = media = \sqrt{\left(\frac{\sum_1^n X}{n}\right)^2} \quad (\text{Ecuación 15})$$

Ecuación 16. Desviación cuadrática media (desviación RMS) o la desviación estándar (dev. St) de las muestras, use los siguientes cálculos.

$$RMS_{desviación} = \sigma = stdev = \sqrt{\frac{\sum_1^n (X_i - X_m)^2}{n}} \quad (\text{Ecuación 16})$$

Dónde:

X_m = el cuadrado medio de la raíz de todos los valores de x en el conjunto

n = número de muestras en el conjunto

X_i = un valor medido del conjunto

3.3.5 Pretratamiento con ácido diluido H_2SO_4

Se evaluó un diseño Simplex con Centroide Ampliado con 10 mezclas para las cuáles se evaluaron los efectos del tiempo de hidrólisis y las fracciones de los tres materiales lignocelulósicos (paja de trigo, rastrojo de maíz y paja de sorgo dulce) sobre la recuperación de azúcares del material hemicelulósico se representan en la Tabla 6:

Tabla 7. Proporción de material en las muestras (peso seco)

	Fracciones másicas			Peso seco de muestras (g)		
	R Trigo	R Maíz	P Sorgo	R Trigo	R Maíz	P Sorgo
R Trigo	1	0	0	6.276	0	0
R Maíz	0	1	0	0	6.264	0
P Sorgo	0	0	1	0	0	6.270



A	0.5	0.5	0	3.138	3.132	0
B	0	0.5	0.5	3.138	0	3.135
C	0.5	0	0.5	0	3.132	3.135
D	0.333	0.333	0.333	2.092	2.088	2.090
E	0.666	0.166	0.166	4.184	1.044	1.045
F	0.166	0.666	0.166	1.046	4.176	1.045
G	0.166	0.166	0.666	1.046	1.044	4.180

Los experimentos para estudiar el efecto del tiempo de pretratamiento se realizaron de 40 g totales en autoclave vertical utilizando 6 g de material mezclados con 34 g de H₂SO₄ (2,0%) como catalizador para obtener una carga de 15% p/p. Estos experimentos se realizaron a una temperatura constante de 130°C y presión de 24 psi; el tiempo promedio para alcanzar esta temperatura fue de 43 min. Se vertió el ácido sobre el material contenido en frascos Schott de 250 ml cuidando que todo quedase impregnado con ácido. Se llevó a cabo la reacción durante 0, 10, 20, y 30 min. Posteriormente, se detuvo la calefacción, se permitió que la presión en la autoclave disminuyera a 5 psi y se enfriaron los frascos a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas líquidas para cuantificar los compuestos solubles mediante HPLC.



Capítulo 4. Resultados y Discusión

4.1 Resultados de la caracterización de los materiales lignocelulósicos: paja de trigo, rastrojo de maíz y sorgo dulce

Los resultados obtenidos en peso seco para la caracterización se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Caracterización de los materiales lignocelulósicos utilizados^a

	Paja Trigo	Rastrojo Maíz	Paja Sorgo Dulce
% Cenizas	14.59±0.09	21.21±0.84	5.03±0.32
% Humedad	4.6±0.25	4.4±0.26	4.5±0.46
% Lignina total	13.94±2.48	26.41±2.95	18.16±2.11
% Glucanos	28.66±0.06	14.79±0.04	40.29±0.02
% Xilanos	17.37±0.02	6.91±0.03	20.45±0.02
% Arabinanos	3.57±0.002	2.77±0.004	2.41±0.0007
% Acetatos	1.46±0.005	0.20±0.004	4.76±0.019
% Otros	15.81	23.31	4.40

^a Muestras analizadas por triplicado.

La Tabla 9 muestra la bibliografía encontrada de la composición de varios cultivos lignocelulósicos de interés industrial (adaptada de Carroll 2009).

Tabla 9. Composición de algunos cultivos energéticos potenciales

	Cenizas	Lignina	Xilanos	Arabinanos
Paja de Trigo	10.22	16.85	19.22	2.35
Rastrojo de maíz	10.06	18.59	21.61	2.42
Sorgo Dulce	5.04	16.09	14.14	1.65



Al comparar los resultados obtenidos, observamos que la bibliografía muestra un mayor contenido de xilanos para el rastrojo de maíz, por lo que podemos interpretar la presencia de contaminantes en el material y un tiempo de vida más prolongado; así mismo, en nuestra caracterización se observa un mayor contenido de carbohidratos totales en el rastrojo de sorgo dulce debido a que el material se encontraba más conservado, limpio y fresco.

Esta misma caracterización muestra las cenizas para cada material lignocelulósico con 14.59%, 21.21% y 5.03% para paja de trigo, rastrojo de maíz y paja de sorgo dulce respectivamente. Resulta ser un valor alto de cenizas para la paja de trigo y rastrojo de maíz en comparación con lo encontrado en la bibliografía, lo que nos hace pensar que pudo deberse a diversos factores como la presencia de hongos que digieren gran parte de los carbohidratos del material, probables contaminantes presentes, al tiempo de vida del material, almacenamiento y/o recolección del material con retroexcavadora, etc.; todos estos son factores posibles que sin embargo no pueden definirse a detalle debido al origen completamente desconocido del material lignocelulósico.

4.2 Resultados de la hidrólisis termoquímica

La recuperación teórica máxima en mg/mL de azúcares obtenida en la hidrólisis de los materiales se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Contenido máximo teórico de carbohidratos estructurales calculado para hidrólisis de 40 g de mezcla, considerando una carga de sólidos del 15 % p/p.

	mg/mL de Glucosa	mg/mL de Xilosa	mg/mL de Arabinosa	mg/mL de Acetato
Paja de Trigo	49.9800	30.9873	6.3804	2.2535
Rastrojo de Maíz	25.7518	12.3032	4.9334	0.3177
Sorgo Dulce	70.1848	36.4422	4.3064	7.3535



En los resultados de la Tabla 10 se muestran los valores máximos teóricos de carbohidratos estructurales como componentes en la hemicelulosa y celulosa de estos materiales lignocelulósicos. Además de ello muestran que los carbohidratos que se encuentra en mayor cantidad son la glucosa y Xilosa. Sin embargo, la hidrólisis termoquímica realizada como pretratamiento ácido en este estudio nos permitió recuperar y cuantificar los azúcares estructurales contenidos únicamente en la hemicelulosa de nuestros materiales, es decir, xilosa, arabinosa y una proporción mínima de glucosa.

4.3 Recuperación de Xilanos

Los xilanos son los carbohidratos encontrados en mayor proporción dentro de la hemicelulosa de nuestros tres materiales, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11, los cuales fueron calculados por duplicado a partir de sus concentraciones obtenidas por cromatografía líquida (HPLC).

Tabla 11. Porcentaje de recuperación de xilosa de mezclas por hidrólisis ácida H_2SO_4 al 2% y 15%p/p.

Recuperación máxima mg/mL de Xilosa		%Recuperación de Xilosa				Fracciones másicas		
		0 min	10 min	20 min	30 min	R Trigo	R Maíz	P Sorgo
RT	35.2128	31.1	44.0	75.8	66.2	1	0	0
RM	13.9808	31.9	62.7	69.9	57.8	0	1	0
SD	41.4116	28.6	45.2	74.2	70.2	0	0	1
A	24.5968	34.6	74.7	57.8	86.4	0.5	0.5	0
B	27.6962	30.4	70.5	52.2	61.4	0	0.5	0.5
C	38.3122	35.4	61.7	54.4	75.9	0.5	0	0.5
D	30.1715	31.0	53.5	50.6	59.0	0.333	0.333	0.333
E	32.6469	26.9	44.4	52.5	63.5	0.666	0.166	0.166
F	22.0309	37.8	43.4	55.0	78.1	0.166	0.666	0.166
G	35.7463	33.4	41.5	50.0	67.0	0.166	0.166	0.666



Los datos obtenidos nos muestran una mayor recuperación a mayor tiempo de hidrólisis, es decir 30 min, de igual manera las concentraciones más elevadas se encuentran en las mezclas con mayor contenido de rastrojo de sorgo dulce. Sin embargo, la recuperación más significativa se dio para la muestra A que contiene la mitad de rastrojo de maíz y mitad de paja de trigo resultando un valor del 86.4% de recuperación. A un tiempo de 20 min podemos observar una variación muy pequeña en todas las mezclas, por lo que podemos considerar que las fracciones másicas a este tiempo no influyen en la recuperación de este carbohidrato.

La figura 30 muestra las concentraciones de xilosa obtenidas para cada muestra analizada por duplicado utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC:

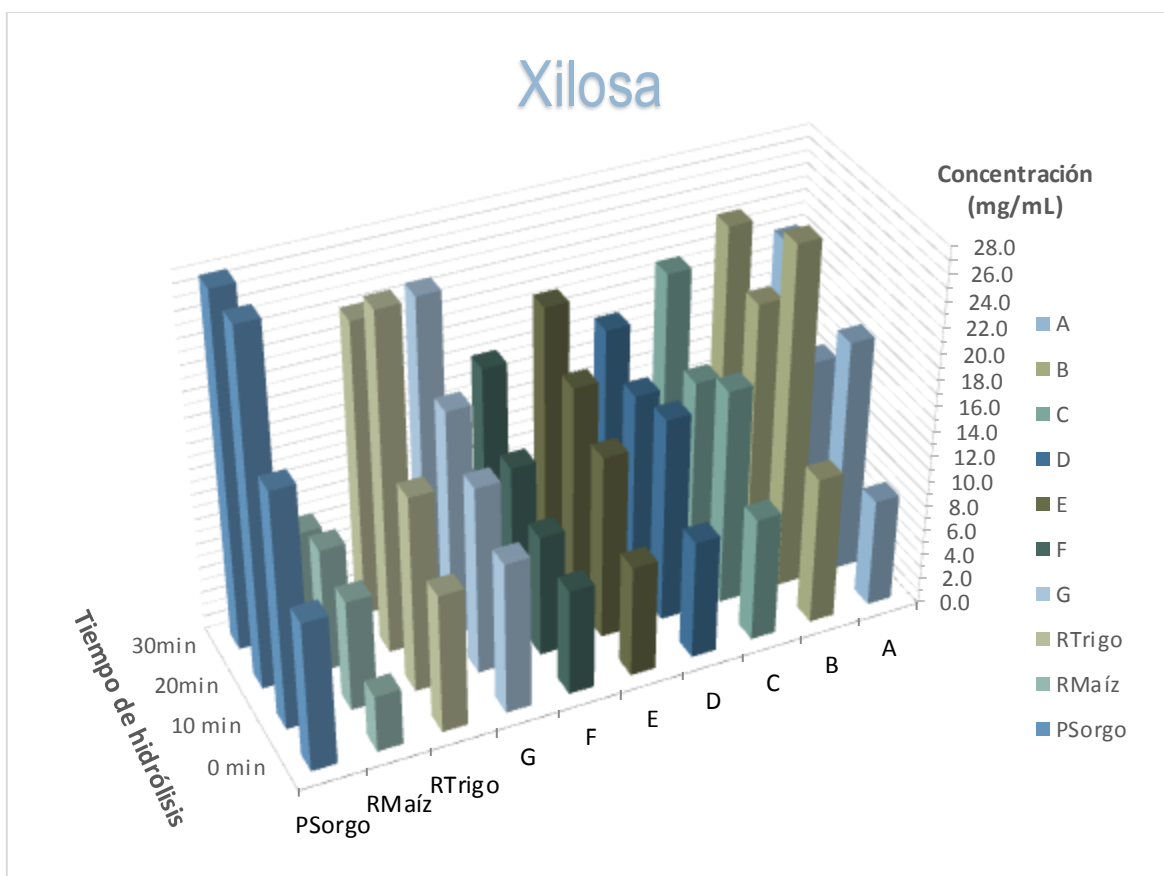


Figura 30. Concentraciones de xilosa en la hidrólisis ácida de los materiales lignocelulósicos y sus mezclas.



4.4 Recuperación de Arabinosa

Los resultados de recuperación de arabinosa obtenidos en la hidrólisis ácida se muestran en la Tabla 12, los cuales fueron calculados por duplicado para cada uno, a partir de sus concentraciones obtenidas por cromatografía líquida (HPLC), la tabla se muestra a continuación.

Tabla 12. Porcentaje de recuperación de arabinanos en las muestras

Recuperación máxima mg/mL de Arabinosa		%Recuperación de Arabinosa				Fracciones másicas		
		0 min	10 min	20 min	30 min	R Trigo	R Maíz	P Sorgo
RT	6.3805	61.9	63.5	64.0	64.8	1	0	0
RM	4.9335	54.4	65.2	51.6	54.8	0	1	0
SD	4.3065	39.0	45.5	59.3	61.8	0	0	1
A	5.6570	44.6	46.1	52.6	59.0	0.5	0.5	0
B	4.6200	43.2	54.2	50.1	44.3	0	0.5	0.5
C	5.3435	49.5	42.6	51.6	58.8	0.5	0	0.5
D	5.2016	46.2	45.3	51.7	42.1	0.333	0.333	0.333
E	5.7832	52.8	42.3	50.8	43.2	0.666	0.166	0.166
F	5.0597	51.6	47.4	51.5	52.0	0.166	0.666	0.166
G	4.7462	45.1	46.0	50.4	48.4	0.166	0.166	0.666

La tabla muestra valores de recuperación de arabinosa de entre 42 – 59% para las mezclas, siendo un valor considerable para una posterior hidrólisis enzimática. Además, se observa que a 20min se puede tener una mejor recuperación que a 30 min, con excepción de las muestras A, C y F que se ven favorecidas con hidrólisis ácida a 30 min.

La figura 31, muestra las concentraciones de arabinosa obtenidas para cada muestra analizada por duplicado utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC.

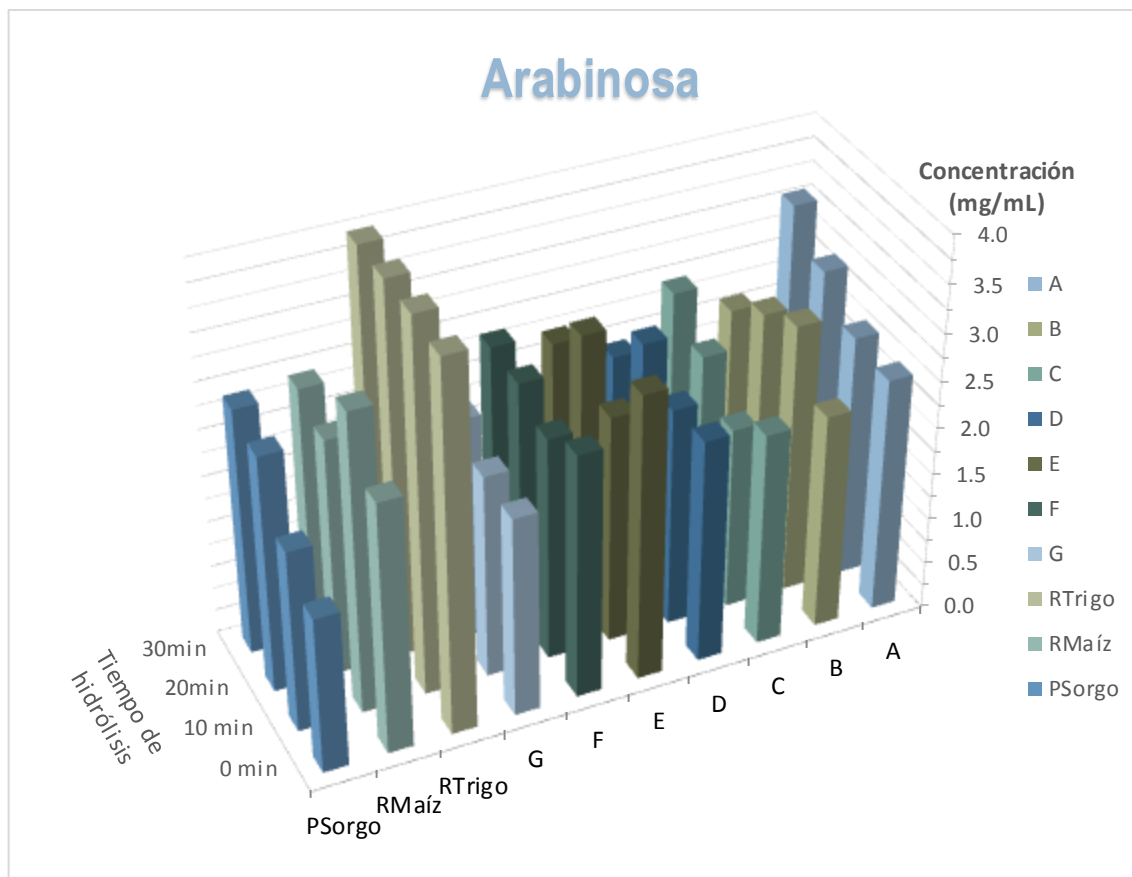


Figura 31. Concentración de arabinosa de los materiales lignocelulósicos y sus mezclas

4.5 Recuperación de Glucosa

Los resultados de recuperación de glucosa obtenidos en la hidrólisis ácida se muestran en la Tabla 13, los cuales fueron calculados por duplicado para cada uno a partir de sus concentraciones obtenidas por cromatografía líquida (HPLC).



Tabla 13. Porcentaje de recuperación de Glucanos en las muestras

Recuperación máxima mg/mL de Glucosa		%Recuperación de Glucosa				Fracciones másicas		
		0 min	10 min	20 min	30 min	R Trigo	R Maíz	P Sorgo
RT	49.9800	5.8	8.6	11.8	11.8	1	0	0
RM	25.7518	13.7	20.6	21.8	21.9	0	1	0
SD	70.1849	6.4	6.5	6.8	7.7	0	0	1
A	37.8659	8.9	13.5	12.1	15.8	0.5	0.5	0
B	47.9683	6.4	10.5	8.0	8.1	0	0.5	0.5
C	60.0825	9.5	9.7	10.3	11.6	0.5	0	0.5
D	48.5903	8.0	9.3	9.7	8.4	0.333	0.333	0.333
E	49.2122	6.4	8.0	9.1	9.0	0.666	0.166	0.166
F	37.0981	10.7	10.8	11.8	12.9	0.166	0.666	0.166
G	59.3146	7.0	7.1	7.8	8.3	0.166	0.166	0.666

Los resultados muestran una recuperación de glucosa mucho menor a la de xilosa, como era de esperarse, debido a que el pretratamiento consiste en la eliminación, reducción o abertura de las fibras de hemicelulosa, y deja prácticamente intactas las fibras de celulosa que son las que contienen la glucosa presente en el material.

Además, se observa que las recuperaciones más elevadas se tienen en las mezclas con mayor contenido de rastrojo de maíz como lo es la muestra F, compuesta de un 66% de rastrojo de maíz, 16.6% de Paja de trigo y 16.6% de Paja de Sorgo Dulce, con un 11.8% a 20 min y 12.9% a 30 min. Y la muestra A, compuesta 50% de Rastrojo de maíz y 50% de Paja de Trigo, con un 12.1% de recuperación a 20 min y 15.8% a 30 min.

La figura 32 muestra las concentraciones de Glucosa obtenidas para cada muestra analizada por duplicado utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC.

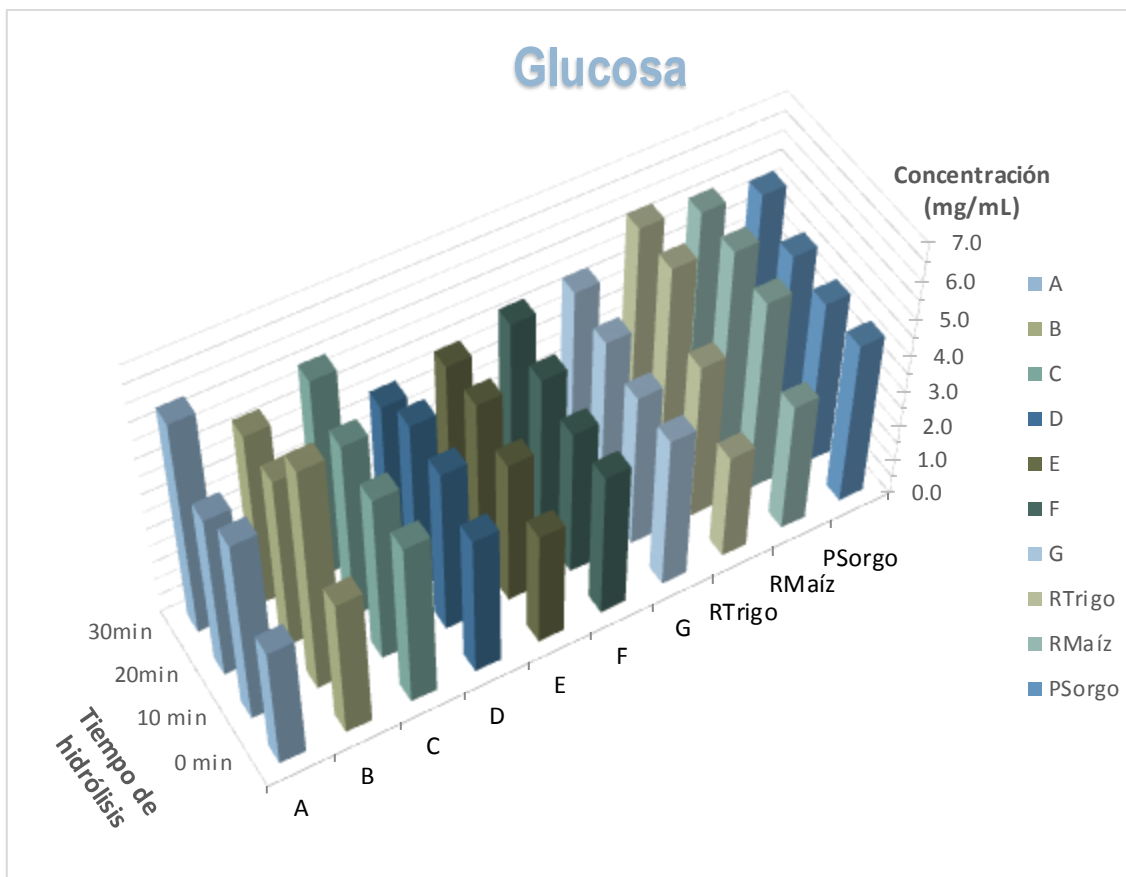


Figura 32. Concentración de Glucosa de los materiales lignocelulósicos y sus mezclas.

En la figura podemos observar que, la mayor concentración de glucosa a un tiempo de 30 min se presentó en la muestra A compuesta de 50% rastrojo de maíz y 50% paja de trigo. Y para el resto de las mezclas (B, C, D, E, F y G) la recuperación de glucosa observada en promedio de 9.7 ± 1.86 %.

4.6 Recuperación de Ácido Acético

Los resultados de recuperación de ácido acético obtenidos en la hidrólisis ácida se muestran en la Tabla 14, los cuales fueron calculados por duplicado para cada uno a partir de sus concentraciones obtenidas por cromatografía líquida (HPLC).



Tabla 14. Concentraciones de ácido acético obtenidas de la hidrólisis ácida al 2% de H₂SO₄

	Concentraciones del pretratamiento ácido (mg/mL)				Fracciones másicas		
	0 min	10 min	20 min	30 min	R Trigo	R Maíz	P Sorgo
A	3.0070	3.6852	3.7513	3.9632	0.5	0.5	0
B	4.8392	6.9904	5.8874	5.1469	0	0.5	0.5
C	4.4556	5.0846	5.1108	5.2977	0.5	0	0.5
D	3.9755	4.4204	4.6422	3.7754	0.333	0.333	0.333
E	4.2666	3.4081	4.5289	3.7603	0.666	0.166	0.166
F	3.0529	3.0344	3.7481	3.6855	0.166	0.666	0.166
G	5.2119	5.4879	6.0651	5.8927	0.166	0.166	0.666

En la figura 33 se muestran las concentraciones de ácido acético obtenidas para cada muestra analizada; éstas fueron analizadas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). En donde se observa que, la concentración de ácido acético recuperado en los experimentos realizados se encuentra entre los 3 y 6 mg/ML.

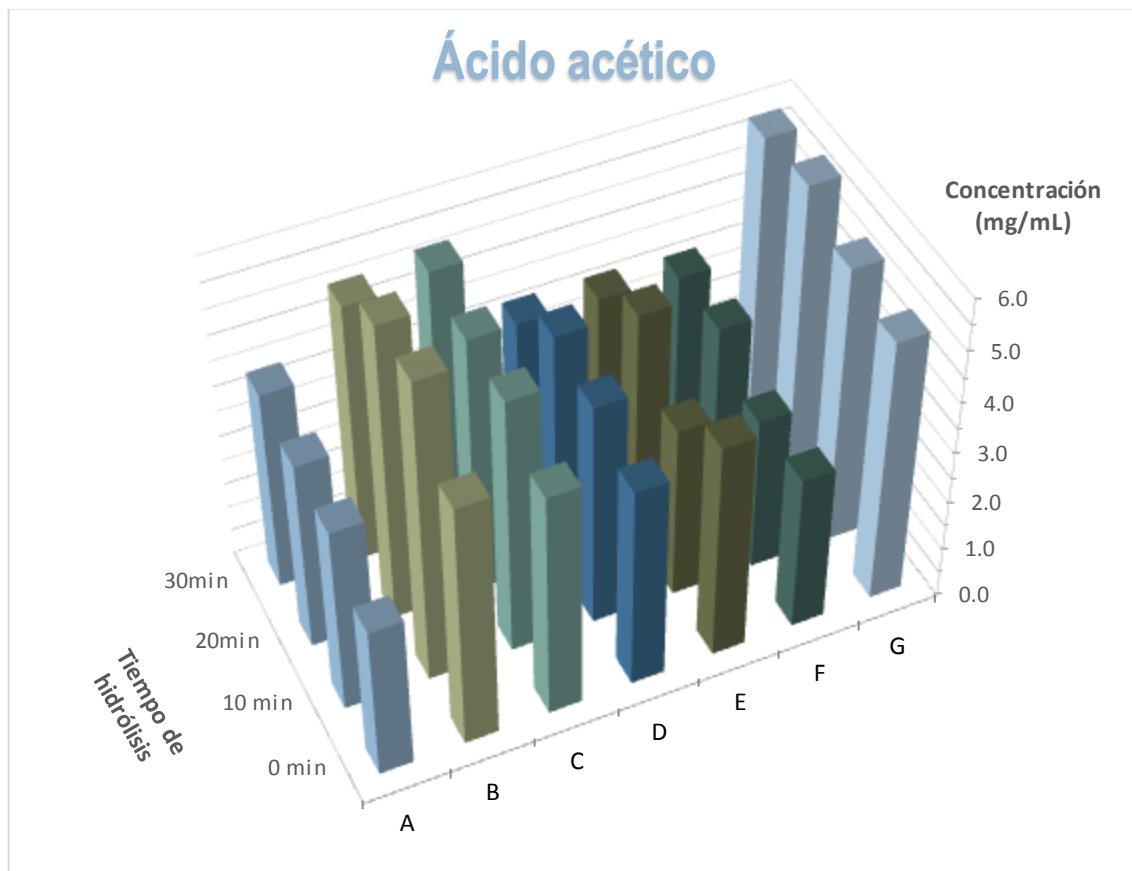


Figura 33. Concentración de ácido acético de las mezclas de materiales lignocelulósicos.

4.7 Recuperación de Hidroximetilfurfural

Los resultados de concentración de hidroximetilfurfural obtenidos en la hidrólisis ácida se muestran en la Tabla 15, los cuales fueron calculados por duplicado para cada uno a partir de sus concentraciones obtenidas por cromatografía líquida (HPLC):



Tabla 15. Concentraciones de hidroximetilfurfural obtenidas en la hidrólisis ácida al 2% de H_2SO_4

	Concentraciones del pretratamiento ácido (mg/mL)				Fracciones másicas		
	0 min	10 min	20 min	30 min	R Trigo	R Maíz	P Sorgo
A	3.0070	3.6852	3.7513	3.9632	0.5	0.5	0
B	4.8392	6.9904	5.8874	5.1469	0	0.5	0.5
C	4.4556	5.0846	5.1108	5.2977	0.5	0	0.5
D	3.9755	4.4204	4.6422	3.7754	0.333	0.333	0.333
E	4.2666	3.4081	4.5289	3.7603	0.666	0.166	0.166
F	3.0529	3.0344	3.7481	3.6855	0.166	0.666	0.166
G	5.2119	5.4879	6.0651	5.8927	0.166	0.166	0.666

Los resultados con el máximo contenido de hidroximetilfurfural se encuentran a 20min, con excepción de nuestras mezclas A y C que resultan con una mayor concentración a un tiempo de 30min de hidrólisis. Este subproducto HMF puede no ser favorecedor para reacciones posteriores en el que este pueda inhibir el crecimiento de microorganismos fermentadores como en el caso de la sacarificación enzimática, lo que debe sin duda ser valorado para determinar los tiempos óptimos de hidrólisis en cada mezcla. De lo contrario, podemos descartar el tiempo de hidrólisis para la obtención de este subproducto ya que la variación de concentración es menor a 1mg/mL de un tiempo a otro.

La figura 34 muestra un gráfico de visualización para las concentraciones de Hidroximetilfurfural obtenidas para cada muestra analizada a diferentes tiempos por duplicado utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC.

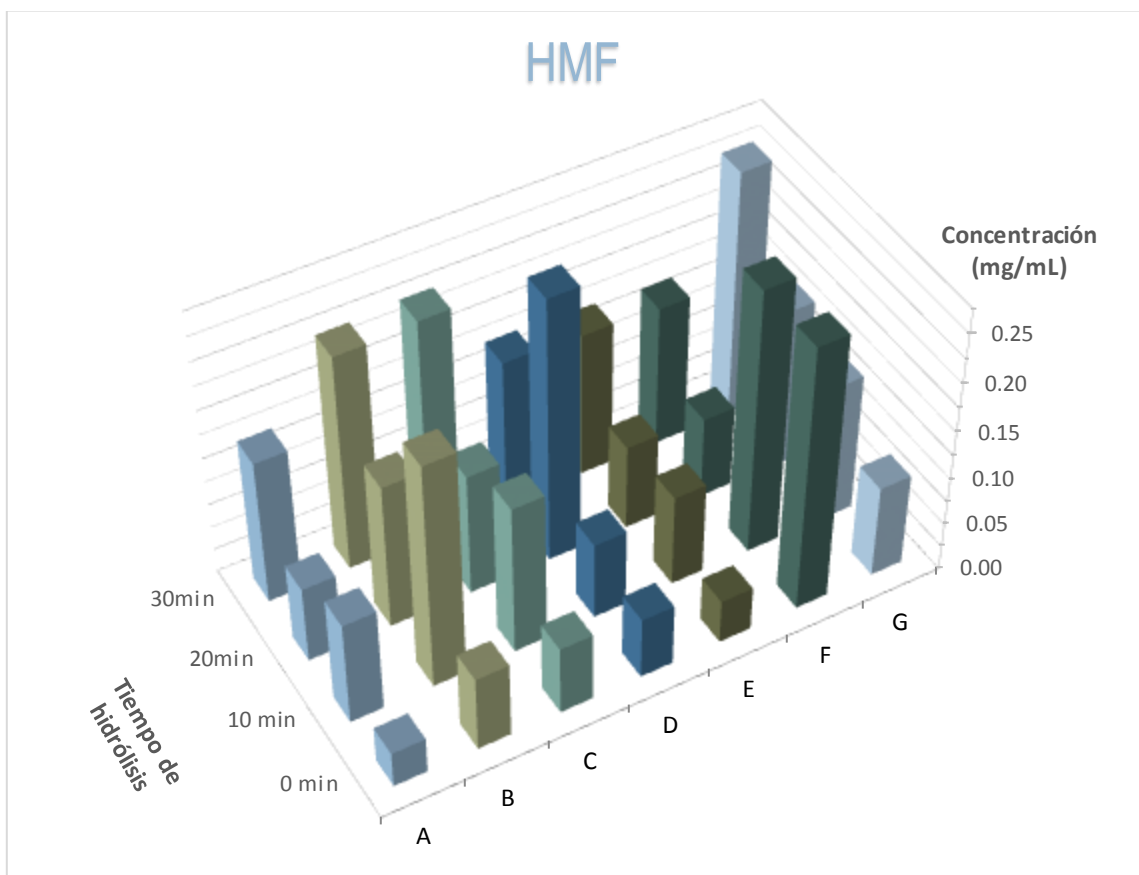


Figura 34. Concentración de 5- hidroximetilfurfural de las mezclas de materiales lignocelulósicos

4.8 Análisis del estudio estadístico de los resultados.

El análisis estadístico de las muestras se basó en los resultados obtenidos de concentraciones de Xilosa, debido a que este carbohidrato está en mayor proporción dentro de la hemicelulosa, y es un producto importante a partir del cual se pueden obtener una gran variedad de productos de valor agregado.



Tabla 16. Concentraciones de Xilosa obtenidas en la hidrólisis ácida al 2% de H₂SO₄

Concentraciones (mg/mL)				Fracciones másicas		
0 min	10 min	20 min	30 min	R Trigo	R Maíz	P Sorgo
10.9530	15.4967	26.6847	23.3133	1	0	0
4.4594	8.7624	9.7778	8.0861	0	1	0
11.8271	18.7330	30.7199	29.0564	0	0	1
8.4990	18.3752	14.2131	21.2535	0.5	0.5	0
11.6426	27.0121	19.9928	23.5375	0	0.5	0.5
9.8033	17.0825	15.0621	21.0152	0.5	0	0.5
9.3630	16.1359	15.2634	17.7982	0.333	0.333	0.333
8.7830	14.5153	17.1539	20.7752	0.666	0.166	0.166
8.3585	9.5742	12.1506	17.2444	0.166	0.666	0.166
11.9659	14.8496	17.9060	23.9705	0.166	0.166	0.666

Para el desarrollo del análisis se utilizó el software estadístico Statistica 10, considerando un intervalo de confianza del 95% y un alfa de 0.05 para cada experimento. Los resultados se pueden observar y comparar como se muestran en la siguiente Figura 35.

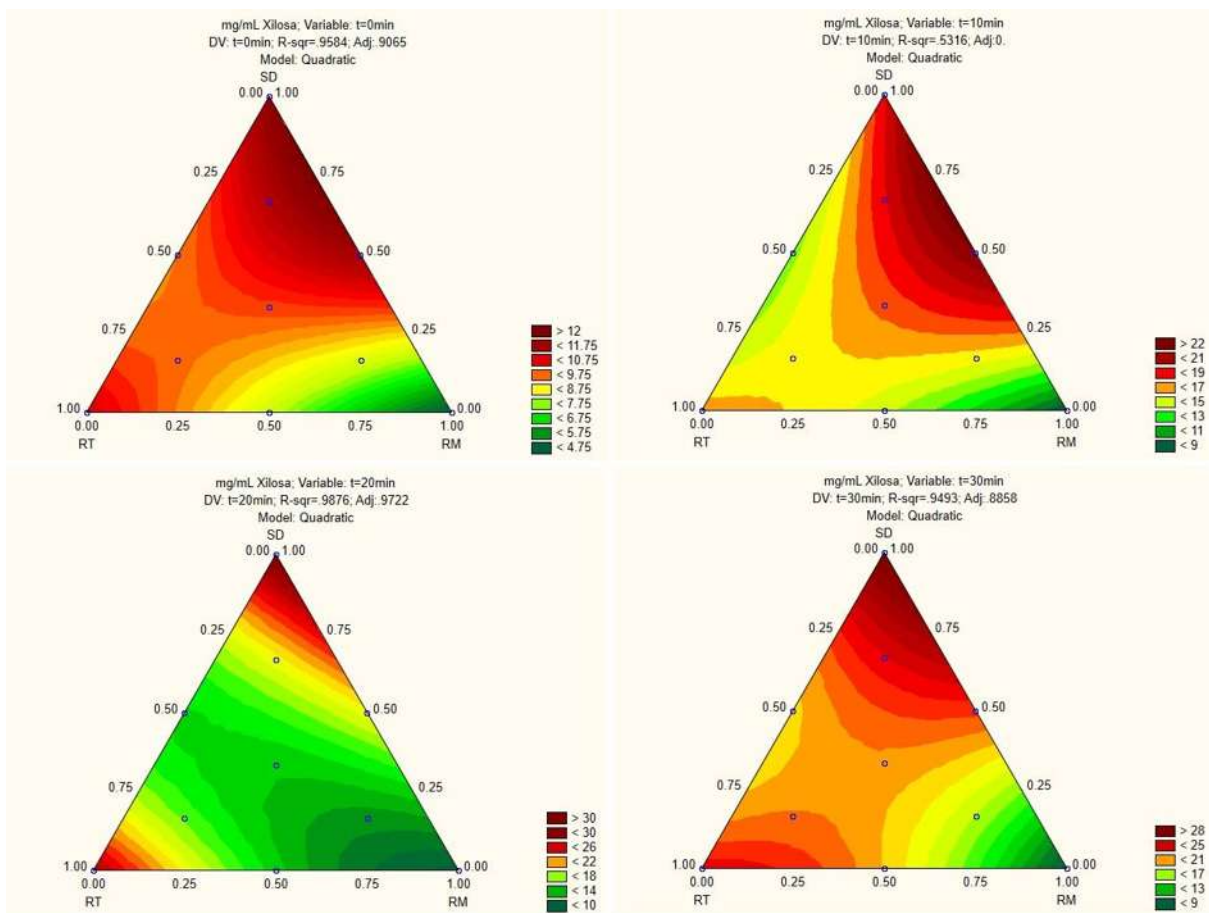


Figura 35. Análisis comparativo de mg/mL de Xilosa a tiempos (0,10, 20, 30 min)

Las gráficas muestran el comportamiento de la concentración para cada material en mg/mL, mostrando notoriamente que el sorgo dulce es el material con mayor contenido de Xilosa estructural, y, siendo las hidrólisis a 20 y 30 min las que favorecen a la recuperación de este carbohidrato.

Posterior a esta observación obtuvimos las ecuaciones de las figuras que mejor coeficiente de correlación resultaron, siendo éstas a 20 y 30 min como se muestra en la Figura 36 de nuestras gráficas Simplex con Centroides ampliado.

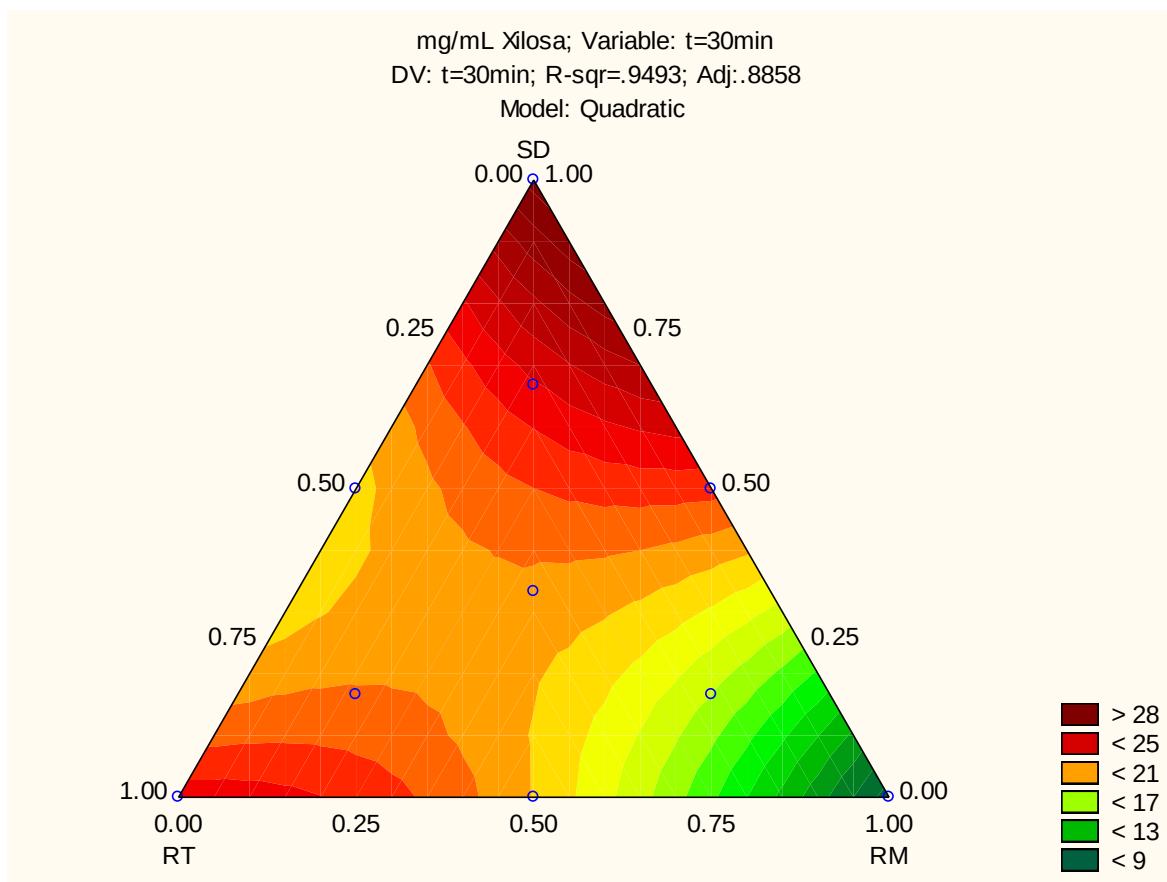


Figura 36. Representación gráfica Simplex con Centroide ampliado en mg/mL de Xilosa a t=30 min

En este análisis estadístico se obtuvo un factor de correlación de 0.9493, lo cual es considerado aceptable dentro de lo establecido por (Ledesma *et al.*, 2013), que considera como asociaciones de correlación alta aquellas variables con coeficientes de correlación mayores a 0.5, y (Colonia *et al.*, 2013) indica que a partir de un coeficiente mayor a 0.60 la correlación es buena, >0.80 casi perfecta, e =1 perfecta.

Los modelos matemáticos que se obtuvieron en este estudio se presentan en la ecuación 17 y ecuación 18.



Ecuación 17. Modelo obtenido sobre el comportamiento de hidrólisis ácida a 30 min para mezcla de tres componentes.

$$Y_{pred} = 23.5246 \cdot X_1 + 8.4940 \cdot X_2 + 29.4048 \cdot X_3 + 15.7321 \cdot X_1 \cdot X_2 - 27.2738 \cdot X_1 \cdot X_3 + 13.6610 \cdot X_2 \cdot X_3$$

(Ecuación 17)

Aquí X_i representa los valores de fracción másica de los materiales lignocelulósicos.

Ecuación 18. Modelo obtenido sobre el comportamiento de hidrólisis ácida a 20 min para mezcla de tres componentes.

$$Y_{pred} = 26.8968 \cdot X_1 + 9.7181 \cdot X_2 + 30.2420 \cdot X_3 - 15.4286 \cdot X_1 \cdot X_2 - 54.7479 \cdot X_1 \cdot X_3 + -1.7518 \cdot X_2 \cdot X_3$$

(Ecuación 18)

Aquí X_i representa los valores de fracción másica de los materiales lignocelulósicos.

Las ecuaciones obtenidas en este estudio se evalúan (ecuación 17 y 18) elaborando dos mezclas aleatorias, el resultado se comparó con el cálculo de la concentración de Xilosa mediante método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), se elaboraron las siguientes mezclas detalladas en la Tabla 17.

Tabla 17. Mezclas de comprobación de modelos matemáticos.

	Fracciones másicas			Peso seco de muestras (g)		
	R Trigo	R Maíz	P Sorgo	R Trigo	R Maíz	P Sorgo
MEZ 1	0.87	0.08	0.05	5.4570	0.5278	0.2947
MZC 2	0.12	0.68	0.20	0.7512	4.2681	1.2523

Los resultados comparables de la evaluación de los modelos obtenidos se muestran en la Tabla 18.



Tabla 18. Comparación de resultados de concentraciones por método de HPLC y modelos matemáticos.

		Resultados HPLC (mg/mL)	Resultados ecuación (mg/mL)	%Error
30min	MEZ 1	20.1161	22.6279	12.5
	MZC 2	12.7111	16.9563	33.4
20min	MEZ 1	26.7888	22.2435	17.0
	MZC 2	14.3110	13.0688	8.7

Los resultados obtenidos a través de las ecuaciones recuperadas por el diseño simplex con centroide ampliado no resultan confiables debido a la desviación que se obtuvo. Para mejorar las desviaciones estándar se debe mejorar y estandarizar el procedimiento experimental y de análisis de muestras, pues uno de nuestros principales problemas fue que observé desviaciones muy grandes desde la lectura obtenida por cromatografía.



Conclusiones

El estudio del efecto del pretratamiento mediante hidrólisis ácida a diferentes porcentajes de materiales lignocelulósicos (paja de trigo, rastrojo de maíz, paja de sorgo) nos permitió llegar a las siguientes conclusiones:

- El material que contiene la mayor cantidad de xilanos fue el que aportó la mayor cantidad de xilosa monomérica en los hidrolizados. En éste caso, a mayor contenido de sorgo dulce en la mezcla, se obtuvo mayor concentración de xilosa en el hidrolizado.
- El tiempo de hidrólisis en el que se obtuvo la máxima concentración de xilanos (**mg/mL**) con una mínima concentración de Furanos (**0.3 mg/mL**) fue de 30 min.
- El estudio estadístico del diseño experimental mostró una recuperación promedio del 68.55 ± 8.7 % para los xilanos para cualquier combinación de materiales. Y de 52.93 ± 7.7 % para los arabinanos.
- A través del estudio realizado se pudo confirmar que es posible generar una sola condición de pretratamiento para mezclas de materiales, obteniendo rendimientos de recuperación de hemicelulosa cercanos al 70 %.

Se sabe que el uso de un solo insumo agroindustrial no podría abastecer la demanda para la producción de algún bioproducto a nivel industrial, por lo que el estudio que realicé, permite saber que si es posible emplear mezclas de diferentes materiales para cubrir dicha demanda.



Bibliografía

- A. Sluiter, B. Hames, D. Hyman, C. Payne, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, and J. Wolfe, Technical Report NREL/TP-510-42621 Revised March 2008, and N. 2008. "NREL/TP-510-42621 Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples." *Food Microbiology* XXV(1): 1–6.
- A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, and D. Templeton, Technical Report NREL/TP-510-42622 January 2008, and NR. 2008. "NREL/TP-510-42622 Determination of Ash in Biomass." *Journal of China Pharmaceutical University* 1(4): 1–5.
- Banerji, Aditi, M. Balakrishnan, and V. V.N. Kishore. 2013. "Low Severity Dilute-Acid Hydrolysis of Sweet Sorghum Bagasse." *Applied Energy* 104: 197–206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.11.012>.
- Carroll, Andrew, and Chris Somerville. 2009. "Cellulosic Biofuels." *The Annual Review of Plant Biology* 60: 165–82. plant.annualreviews.org.
- Cortínez, Victoria. 2010. "COMPARACIÓN DE PRETRATAMIENTOS EN RESIDUOS FORESTALES PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN: HIDRÓLISIS ÁCIDA Y LÍQUIDOS IÓNICOS." *Universidad de Chile. Facultad de ciencias físicas y matemáticas. Departamento de ingeniería química y biotecnología* 1: 133.
- Faba, L, E Díaz, and S Ordóñez. 2014. "From Biomass to Second Generation Biofuels ." *Madera Bosques* 20(3): 11–24. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84956518068&partnerID=40&md5=63340cd37ff01ee241f5ae190d74d3d1>.
- Feliua, S., and M.C. Andrade. 1991. "CORROSIÓN EN LA INDUSTRIA QUÍMICA." *Departamento de Química Física. Universidad de Alicante* 1(Tema 11): 157. <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8237/1/CorrTema11.pdf>.
- Guarnizo Franco, Anderson; Martínez Yépes, Pedro Nel; and Valencia Sánchez, Hoover Albeiro. 2009. "Pretratamientos De La Celulosa Y Biomasa Para La Sacarificación." *Scientia Et Technica*, XV: 284–89. <http://www.redalyc.org/pdf/849/84916714053.pdf>.



- Jirakarn, Nantapipat, Luengnaruemitchai Apanee, and Wongkasemjit Sujitra. 2013. "A Comparison of Dilute Sulfuric and Phosphoric Acid Pretreatments in Biofuel Production from Corncobs." *International Journal of Chemical and Molecular Engineering* 7(4): 197–201. <https://waset.org/publications/3588/a-comparison-of-dilute-sulfuric-and-phosphoric-acid-pretreatments-in-biofuel-production-from-corn-cobs>.
- Kuehl, Robert O. 2001. *Diseño de Experimentos Principios Estadísticos de Diseño y Análisis de Investigación*. 2a ed. ed. Thomson Learning. editor@thomsonlearning.com.mx.
- Mikulski, D., and G. Kłosowski. 2018. "Efficiency of Dilute Sulfuric Acid Pretreatment of Distillery Stillage in the Production of Cellulosic Ethanol." *Bioresource Technology* 268(June): 424–33.
- Piñeros, Yineth. 2016. *APROVECHAMIENTO DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA, ALGUNAS EXPERIENCIAS DE INVESTIGACIÓN EN COLOMBIA*. Primera ed. Bogotá, Colombia: Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. www.utadeo.edu.co0Aprovechamiento.
- Prinsen, Pepijn. 2012. "Composición Química de Diversos Materiales Lignocelulósicos de Interés Industrial y Análisis Estructural de Sus Ligninas." *The Journal of Nihon University School of Dentistry* 25(4): 284–92.
- Reyes-Muro, Luis, Tania Carolina Camacho-Villa, and Francisco Guevara-Hernández. 2013. *Rastrojos. Manejo, Uso y Mercado En El Centroy Sur de México. Libro Técnico Núm. 7*.
- Saha, Badal C., Loren B. Iten, Michael A. Cotta, and Y. Victor Wu. 2005. "Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification and Fermentation of Wheat Straw to Ethanol." *Process Biochemistry* 40(12): 3693–3700.
- Sánchez Riaño, A.M., A. I. Gutiérrez Morales, J. A Muñoz Hernández, and C. A. Rivera Barrero. 2010. "Bioethanol Production from Agroindustrial Lignocellulosic Byproducts." *Tumbaga* 5: 61–91. <http://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/view/194/163>.
- Schell, Daniel J., Jody Farmer, Millie Newman, and James D. McMillan. 2003. "Dilute-Sulfuric Acid Pretreatment of Corn Stover in Pilot-Scale Reactor: Investigation of Yields, Kinetics, and Enzymatic Digestibilities of Solids." *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* 108(1–3): 69–86.



- Sluiter, A. et al. 2018. "NREL/TP-510-42618 Analytical Procedure - Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass." *Food Microbiology* 7(3): 1–14. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03610470.2018.1546072><http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.104><http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.005><http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2015.01.019><http://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618>.
- Vargas-Tah, Alejandra et al. 2015. "Non-Severe Thermochemical Hydrolysis of Stover from White Corn and Sequential Enzymatic Saccharification and Fermentation to Ethanol." *Bioresource Technology* 198: 611–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.036>.
- Ventura, S. et al. 2012. "Guidelines for Sustainable Planting and Harvest of Nonforest Biomass in Wisconsin." *Journal of Soil and Water Conservation* 67(1): 17A-20A. https://www.researchgate.net/publication/261614148_Wisconsin_Sustainable_Planting_and_Harvest_Guidelines_for_Nonforest_Biomass.
- Xuebing Zhao, Lihua Zhang and Dehua Liu. 2012. "Perspective: Jatropha Cultivation in Southern India: Assessing Farmers' Experiences." *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 6(6): 561–79.