

Universidad de Matanzas
“Camilo Cienfuegos”
Facultad de Ingenierías
Departamento de Química e Ingeniería Química



**Trabajo de Diploma en opción al título de
Ingeniero Químico**

“Deslignificación alcalina de marabú pretratado con Glicerol”

Autor: Roberto Triana Figueroa

Tutor: MSc. Dani Jesús Rodríguez Álvarez

Matanzas, Junio, 2011.

Nota de aceptación

_____ Presidente del Tribunal	_____ Firma
_____ Secretario del Tribunal	_____ Firma
_____ Miembro del Tribunal	_____ Firma
_____ Miembro del Tribunal	_____ Firma
_____ Miembro del Tribunal	_____ Firma
_____ Ciudad	_____ Fecha

Declaración de autoridad

Declaro ser el único autor de este trabajo de diploma que lleva como título: "*Deslignificación alcalina de marabú pretratado con glicerol*", que pertenece de manera íntegra a la Facultad de Ingenierías de la Universidad de Matanzas. Autorizo para su consulta a todo aquel que la necesite, quedando prohibida la reproducción total o parcial de este documento.

Firma

Pensamiento

"Aquél que procura asegurar el bienestar ajeno, ya tiene asegurado el propio."

Confucio.

Dedicatoria

Dedico este trabajo de Diploma a las personas más importantes de mi vida: a mi MADRE, a mi hermanita y a mi novia. Tres mujeres que son la inspiración y el deseo de una felicidad en curso.

Agradecimientos

- A mi madre, por ser mi guía, mi faro y el hombro tan ansiado.
- A mi novia, por su ayuda servicial, por ese apoyo en tiempos de desesperación, por su presencia oportuna, por convertirse a mi lado en una ingeniera química aficionada, y sobre todo por soportar la carga de esta persona.
- A mi abuelo, por ser un amante y velador de mi superación académica.
- A mi tutor MSc. Dani Rodríguez por ofrecerme de manera incondicional su apoyo, por brindarme sus conocimientos y experiencia, por compartir su tiempo libre para el cumplimiento de este trabajo, por su paciencia, mostrando siempre la cualidad de educador, muchísimas gracias.
- Al Dr. Carlos Martín “*Carlitos*” por darme la posibilidad de materializar este Trabajo de Diploma haciéndome un integrante activo dentro de su grupo de investigación.
- A ese maravilloso claustro de profesores que me ha dado la preparación necesaria para hacer de este anhelo una realidad, en especial a Ena y Teresita (aunque ya no esté), por ser personas admirables.
- A Jose, por su disposición y entrega a la labor que realiza, y sobre todo por permitirme ser uno más dentro del personal de los laboratorios de química, los cuales dirige.
- A Tania y Carmen, por su ayuda incesante y por los numerosos momentos de molestia sin recibir un no por respuesta.
- A Michael, por brindarme su ayuda en todo momento.
- A mi familia del Q-51, porque todos hemos aprendido a querernos de corazón, respetando la personalidad de cada quien, tolerando los defectos y virtudes que nos identifican.”*Somos un grupo de amigos donde la distancia solo provocará incrementar las ansias del reencuentro*”.

Resumen

El empleo de etanol como combustible automotor es una necesidad a nivel mundial. La producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos (MLC) es una importante alternativa a la producción tradicional a partir de materias primas azucaradas y amiláceas. Entre las materias primas que encontramos en Cuba, una de mucho interés es el marabú (*Dichrostachys cinerea*), planta invasora que cubre grandes extensiones del área cultivable de la Isla, y cuya erradicación generará grandes cantidades de biomasa lignocelulósica que podría ser considerada para la producción de etanol y otros productos de alto valor agregado. Para esto, se realizó un análisis completo de la composición química de la biomasa de marabú, determinando sus componentes, tales como lignina (29.2%), hemicelulosas (31.75%), celulosa (30.97%), minerales (2.45%) y sustancias extractivas (5.63%). En este trabajo se realizaron dos etapas de tratamiento químico de deslignificación: un pretratamiento con glicerol al 60%, donde se obtuvo 74.67% de rendimiento de sólidos, lográndose un 45.45% de solubilización de la lignina, una segunda etapa de deslignificación alcalina con hidróxido de sodio, para lo cual se realizó un diseño de experimentos en esta última etapa con el auxilio del software *STATGRAPHICS Plus versión 5.0 para Windows*, obteniéndose como resultado pulpas enriquecidas en celulosa y un aumento en el grado de deslignificación, mostrando que en el primer experimento realizado con 2.5% de hidróxido de sodio, a 100°C de temperatura y con una duración de 90 minutos, se obtuvo una pulpa con 77.24% de celulosa, 16.5% de hemicelulosas y 6.47% de lignina. Se comprobaron las potencialidades de la convertibilidad enzimática de la biomasa de marabú para ser utilizada como materia prima para la obtención de etanol con más de 50 % de convertibilidad en todos los casos. Finalmente, se estudiaron las condiciones para una precipitación adecuada de la lignina y las hemicelulosas a partir de los licores generados de los pretratamientos.

Abstract

The use of ethanol as fuel for cars is one of the needs now a days all over the world. The production of ethanol from lignocellulosic materials (LCM) is an important alternative against traditional production from sugars and starches raw materials, because there are no sufficient of those to supply the demand of fuels and food.

LCM are a cheap and abundant source of raw materials and can be obtained from agricultural residues, forest, industrial and municipal residues. Marabou (*Dichrostachys cinerea*) is an abundant lignocellulosic bioresource that could be of interest for ethanol production in Cuba, today it has expanded all over the island infesting arable and grazing areas and causing significant losses in agricultural production. The mechanical control will generate huge amounts of biomass, which could be a potential source of sugars for production of ethanol and other chemicals.

The compositional analysis of marabou biomass was perform in order to know the main components, among them lignin (29.2%), hemicelluloses (31.75%), cellulose (30.97%), minerals (2.45%) and extractives (5.63%).

Two steps of chemical treatment were applied in this work, first of them with 60% water solution of glycerol, where the yield of solids was 74.67%, the solubilisation of lignin achieved was 45.45% and the second one, alkaline delignification with sodium hydroxide, the results show pulps enriched in cellulose and high degree of delignification, the best results are showed in the first experiment with 2.5% of sodium hydroxide, at 100°C of temperature, performed during 90 minutes of time, the analyzed pulp had 77.24% of cellulose, 16.5% of hemicelluloses and 6.47% of lignin. To perform the experimental design was used *STATGRAPHICS Plus version 5.0 software for Windows, in order to know the potential of marabou biomass for enzymatic hydrolysis, as raw material for ethanol production and other products of high added value*. As a result of enzymatic hydrolysis more of 50% of enzymatic convertibility was achieved for all the pulps.

At the end were studied the conditions for adequate precipitation of lignin and hemicelluloses from liquors generated during pretreatments.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1: Análisis bibliográfico	3
1.1. Agotamiento de las reservas de combustible fósiles	3
1.1.1. Antecedentes históricos de etanol como combustible	4
1.1.2. Producción tradicional de etanol	5
1.1.3. Producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos	5
1.1.4. Producción de bioetanol y el medio ambiente	6
1.1.5. Competencia entre biocombustible y la alimentación humana	7
1.2. Materiales lignocelulósicos	8
1.2.1. Composición de los materiales lignocelulósicos	8
1.2.2. Celulosa	9
1.2.2.1. Estructura molecular	10
1.2.2.2. Propiedades poliméricas de la celulosa	12
1.2.3. Reacciones químicas de la celulosa	12
1.2.3.1. Hidrólisis de la celulosa	12
1.2.3.2. Determinación de la celulosa	13
1.2.4. Lignina	14
1.2.4.1. Grupos funcionales	16
1.2.4.2. Estructura de la lignina	16
1.2.4.3. Reacciones de la lignina	17
1.2.4.4. Reacciones de destrucción hidrolítica y condensación	18
1.2.5. Hemicelulosas	19
1.2.5.1. Hemicelulosas de las maderas blandas	19
1.2.6. Extractivos	21
1.3. Métodos de pretratamientos de los materiales lignocelulósicos	22
1.3.1. Métodos físicos	23
1.3.2. Métodos físico-químicos	23
1.3.3. Métodos químicos	24
1.3.3.1. Tratamiento organosolv con glicerol	27
1.3.3.2. Hidrólisis alcalina	28
1.4. Hidrólisis enzimática	28
1.5. Marabú (<i>Dichrostachys Cinerea</i>)	29
1.6. Conclusiones parciales	31
Capítulo 2: Materiales y Métodos	32

2.1. Etapas de la investigación	32
2.1.1. Materia prima	32
2.2. Caracterización de la materia prima	33
2.2.1. Determinación de humedad	33
2.2.2. Determinación de cenizas	34
2.2.3. Determinación de sustancias extractivas	34
2.2.4. Determinación de polisacáridos fácilmente hidrolizables	35
2.2.5. Determinación de polisacáridos difícilmente hidrolizables	36
2.2.6. Determinación de hidrólisis ácida analítica y lignina de Klason	37
2.2.7. Determinación de azúcares reductores totales	37
2.3. Pretratamiento organosolv con glicerol	38
2.3.1. Parámetros de caracterización físico-química para las materias sólidas obtenidas en el pretratamiento organosolv	38
2.3.2. Parámetros de caracterización físico-química para los licores producidos por el pretratamiento organosolv con glicerol	39
2.3.3. Precipitación química de la lignina en los licores obtenidos por pretratamiento organosolv con glicerol	39
2.4. Diseño estadístico en la etapa de deslignificación alcalina adicional	40
2.4.1. Precipitación química de la lignina en los licores obtenidos por pretratamiento alcalino adicional	41
2.4.2. Hidrólisis enzimática	41
Capítulo 3: Análisis de resultados	42
3.1. Caracterización de la materia prima	42
3.2. Pretratamiento con glicerol	43
3.2.1. Precipitación química de la lignina y las hemicelulosas en los licores obtenidos por cambio de disolvente	47
3.3. Deslignificación alcalina adicional	48
3.4. Hidrólisis enzimática	56
4. Conclusiones	58
5. Recomendaciones	59
6. Bibliografía	60
7. Anexos	70

Introducción

Durante los últimos años ha crecido el número de investigaciones científicas dirigidas al uso de los biocombustibles, tales como el etanol y el biodiesel, como alternativas a la gasolina y al combustible diesel para el transporte (Agarwal, 2007). La búsqueda de alternativas no competitivas con los alimentos es una necesidad, por lo que algunos materiales de desecho han tenido prioridad en las investigaciones para la obtención de etanol (Prasad *et al.*, 2007). Los materiales lignocelulósicos son considerados los recursos renovables más abundantes disponibles para la producción industrial de etanol combustible (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; Prasad *et al.*, 2007). Han sido investigados diferentes procesos en búsquedas de métodos de pretratamiento eficientes y costeables para diferentes materiales (Eggeman y Elander, 2005; Mosier *et al.*, 2005). Los pretratamientos organosolv permiten adecuar la celulosa a la acción de las enzimas mediante el uso de disolventes orgánicos que solvolizan y solubilizan la lignina y parte de las hemicelulosas (Itoh *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2006).

Durante las últimas décadas, la agricultura cubana ha estado seriamente afectada por la infestación de sus campos por el marabú (*Dichrostachys cinerea*), planta invasora que ha ocupado extensas áreas a lo largo y ancho del país (Moyroud, 2000; Wakeling *et al.*, 2007).

Recientemente, el estado cubano ha comenzado un programa nacional para la eliminación del marabú, este programa puede generar una enorme acumulación de biomasa, la cual sería subutilizada si su único uso fuese como combustible sólido (leña o carbón). Este biorrecurso sería mucho mejor aprovechado si se procesara en biorrefinerías lignocelulósicas para la producción de etanol celulósico, alimentos, plásticos verdes y otros productos de alto valor económico y social. Para ello, es necesario separar la celulosa, las hemicelulosas y la lignina contenidos en la materia prima, y procesar cada uno de esos componentes para la obtención de derivados específicos.

En trabajos realizados anteriormente en la Universidad de Matanzas se ha investigado la convertibilidad enzimática de pulpas obtenidas por el método

acetosolv (Rodríguez, 2011; Venkata *et al.*, 2011) y por el método organosolv con glicerol (Rodríguez, 2011, inédito), no lográndose altos valores de convertibilidad enzimática, lo cual fue atribuido al alto contenido de lignina remanente en las pulpas.

La hidrólisis enzimática de la celulosa es el proceso más prometedor para producir azúcares fermentables a partir de materiales lignocelulósicos, pero requiere de una fase de pretratamiento para hacer la celulosa accesible para las enzimas (Sun y Cheng, 2002). Por tales razones se puede formular el siguiente **problema científico**:

¿Cómo se puede reducir el contenido de lignina en pulpas de organosolv, el cual afecta el proceso de convertibilidad enzimática en la producción de etanol celulósico?

Como vía de solución al problema en cuestión se plantea la siguiente **hipótesis**:

Si aplicamos un proceso de deslignificación adicional con disoluciones de hidróxido de sodio, entonces se logrará reducir el contenido de lignina en pulpas de organosolv.

Teniendo en consideración los aspectos anteriores el presente trabajo tiene como **objetivo general**:

Aplicar una deslignificación adicional con hidróxido de sodio que permita reducir el contenido de lignina en pulpas de organosolv.

Para dar cumplimiento al objetivo general se formulan los siguientes **objetivos específicos**:

- Determinar la composición química de la biomasa de marabú.
- Investigar el efecto de la deslignificación adicional con hidróxido de sodio de los sólidos obtenidos del pretratamiento organosolv con glicerol.
- Determinar la convertibilidad enzimática de las pulpas obtenidas en la deslignificación alcalina adicional.

Capítulo 1: Análisis bibliográfico

1.1 Agotamiento de las reservas de combustibles fósiles

Las preocupaciones mundiales por la disminución de las reservas de combustibles fósiles, por el aumento de los precios del petróleo y por el incremento de los gases de efecto invernadero han atraído el interés científico al uso y producción de los biocombustibles, principalmente el etanol y el biodiesel, como alternativas renovables a los combustibles fósiles (Agarwal, 2007). El uso masivo de combustibles fósiles ha provocado un considerable aumento de la cantidad de dióxido de carbono (CO_2) en la atmósfera terrestre, llegando a constituir una amenaza para la preservación de las condiciones climáticas naturales. El uso de biocombustibles, como el etanol, reduce el impacto ambiental generado por las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) (Rass-Hansen *et al.*, 2007). El etanol es un combustible producido a partir de recursos renovables y su uso permite reducir el nivel de GEI, ya que aunque se libera dióxido de carbono durante su producción y combustión, las plantas de las cuales se produce el etanol utilizan dióxido de carbono de la atmósfera en el proceso de fotosíntesis. Se ha demostrado que por cada metro cúbico de etanol utilizado como combustible se evitan emisiones de 1.7-2.6 t de dióxido de carbono (Macedo, 2004).

El etanol tiene un mayor índice de octano que la gasolina, combustiona más completamente y emite menos sustancias contaminantes a la atmósfera, tales como monóxido de carbono, combustible sin combustionar, óxidos de nitrógeno y compuestos orgánicos volátiles (Bailey, 1996; Cordovés, 2001; Demirbas, 2008). Además, el etanol es biodegradable y es menos agresivo al medio ambiente, por otra parte no contamina las aguas subterráneas ni el suelo (Wyman, 1999). La transformación de la biomasa a combustible líquido como el etanol, ha sido de gran interés desde finales del siglo XX. El bioetanol fue producido a gran escala durante las dos guerras mundiales, usando hidrólisis ácida como método de pretratamiento, pero después del año 1940 fue desestimado (De Armas, 2000). Solamente en la Unión Soviética la producción de etanol basada en la hidrólisis ácida de la madera continuó ininterrumpidamente, produciéndose en la actualidad en Rusia (Khol'kin *et al.*,

1999). Las nuevas exigencias hacia la protección del medio ambiente emanadas de la Cumbre de la Tierra (1992) y la incertidumbre sobre un suministro estable de petróleo crudo condujeron a que en la década de los noventa se incrementara el interés por la producción de bioetanol (Costales y Namer 2000).

1.1.1 Antecedentes históricos del etanol como combustible

La historia del uso del etanol como combustible es tan larga como la historia del automóvil (Martín, 2002). El motor de combustión interna inventado por Nikolaus Otto en 1887 fue diseñado originalmente para ser propulsado con etanol (Tengborg, 2000), sin embargo, durante la mayor parte del siglo XX el etanol solamente resultó atractivo en tiempos de guerra. Hoy todos los carros pueden trabajar con mezclas de 3-22 % de etanol con gasolina sin necesidad de hacer modificaciones en el motor (Berg, 1998).

El etanol hidratado, como combustible automotor, puede ser usado como sustituto de la gasolina solo en máquinas especiales, mientras que el etanol anhidro, para el cual los motores no requieren modificaciones, es un impulsor efectivo del octanaje cuando se usa en mezclas de 5 a 30% (Licht, 2006). Una invención reciente que ha devenido altamente popular en Brasil y otros países es un nuevo tipo de motor bi-combustible, con el cual funcionan los llamados vehículos *flex* o *flexi-fuel*, los que se abastecen con gasolina o con etanol hidratado en cualquier proporción (Nunes de Vasconcelos, 2008). En los últimos años, el crecimiento del uso del etanol combustible en el mundo y la preocupación por desvincular su producción de las materias primas que compitan con la alimentación humana ha elevado considerablemente el interés por la producción de etanol celulósico. Esto ha llevado a la propuesta de diversos procesos tecnológicos, tanto basados en la hidrólisis ácida como en hidrólisis enzimática (Bueno, 2008). Las nuevas tecnologías son evaluadas en plantas pilotos y demostrativas, entre las cuales las más importantes están en Suecia, EE.UU., España, Canadá, Italia, Dinamarca, Japón y China (Bueno, 2008). Varias de esas tecnologías ya se encuentran en estado inicial de explotación y para el futuro inmediato se percibe una considerable expansión de la producción de etanol a partir de los materiales lignocelulósicos. Desde el

2006 en Salamanca, España, opera una planta de etanol celulósico a escala semindustrial, la cual fue construida por Abengoa Bioenergy y la misma tiene un volumen de 5 millones de litros de etanol por año a partir de paja de trigo (Abril, 2008).

1.1.2. Producción tradicional de etanol

El etanol puede ser producido por dos vías, química, que no es más que la hidratación del etileno en presencia de un catalizador y bioquímica, la cual se basa en la fermentación de materiales ricos en glúcidos por la acción de microorganismos. Cerca del 91% del etanol producido en el mundo es logrado por fermentación, mientras que solo el 9% es producido sintéticamente (Wheeler *et al.*, 1991).

En la producción de etanol por la vía fermentativa los microorganismos más usados son las levaduras del género *Saccharomyces* (Hernández et al., 1986 y Ingledew, 1995). En la elaboración de etanol por fermentación las materias primas utilizadas son azucaradas, amiláceas y lignocelulósicas. Las azucaradas poseen la ventaja de que sus carbohidratos componentes están en forma de monosacáridos y oligosacáridos, por lo que el sustrato logra ser fermentado eficientemente por los microorganismos productores. La industria alcoholera cubana goza de una larga y prestigiosa experiencia en la producción de etanol a partir de la mieles finales de la producción azucarera (ICIDCA, 1987). En Cuba, debe tenerse en cuenta que los sectores del transporte e industrial son altos consumidores de combustibles, debido a que prácticamente la totalidad de la generación eléctrica se realiza a partir de petróleo crudo y gas acompañante de origen nacional y que el número de vehículos e industrias aumentan considerablemente con la reanimación de la economía cubana, el peso del sector automotor en el consumo de combustible se ha elevado y continuará elevándose en un futuro inmediato.

1.1.3. Producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos

El proceso para la producción de etanol a partir de la celulosa, en principio es muy sencillo, una hidrólisis de la celulosa a glucosa con una posterior fermentación, con la consiguiente destilación para obtener el bioetanol hasta

un 95 % en volumen y la posterior deshidratación para obtener etanol absoluto (99 % en volumen), por destilación con mezclas de benceno, agua y etanol o utilizando tamices moleculares. Llevando a cabo una tecnología económicamente factible se podría reducir la dependencia del petróleo crudo (Brizuela et al., 2000). Los productos principales de la fermentación alcohólica son el etanol y el dióxido de carbono, así como varios productos colaterales como glicerol, acetaldehído, alcoholes superiores, ésteres, éteres, ácidos, cetonas y otros compuestos. Toda tecnología para la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica debe contener una etapa de hidrólisis de los polisacáridos contenidos en su estructura, de manera que se obtengan azúcares simples que puedan ser convertidos en etanol por fermentación (Cuzens y Miller, 1996; Demirbas, 2007). Esta hidrólisis puede ser efectuada por ácidos o por enzimas (Tengborg, 2000). La hidrólisis enzimática no degrada los azúcares pero como desventaja tiene, su lentitud y el alto costo de las enzimas, mientras que la hidrólisis ácida diluida posee un bajo consumo de ácido, aunque provoca corrosión debido a las altas temperaturas (Nguyen, 1993; Di Pardo, 2000; Martín, 2002).

1.1.4. Producción de bioetanol y el medio ambiente

Los materiales lignocelulósicos son considerados los recursos renovables más abundantes disponibles para la producción industrial de etanol como combustible (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; Prasad *et al.*, 2007). La producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos requiere de la conversión de carbohidratos complejos en azúcares simples que puedan ser fermentados usando microorganismos etanologénicos. La hidrólisis enzimática de la celulosa es el proceso más prometedor para producir azúcar fermentable a partir de materiales lignocelulósicos, pero requiere de una fase de pretratamiento previo a esta para hacer la celulosa accesible a las enzimas (Sun y Cheng, 2002). Han sido investigados diferentes métodos para diseñar estrategias de pretratamiento eficientes y costeables para diferentes materiales lignocelulósicos (Eggeman y Elander, 2005 *et al.*; Mosier *et al.*, 2005).

El uso del bioetanol también está relacionado con la protección del medio ambiente, ejerciendo un menor impacto sobre este. El bioetanol como combustible automotor contribuirá considerablemente a la disminución de la contaminación ambiental, ya que es un combustible obtenido a partir de la biomasa, por lo que no aporta dióxido de carbono neto a la atmósfera y así no contribuye al incremento del efecto invernadero. El uso masivo del etanol combustible en Brasil provocó una reducción de las emisiones en 46.7 millones t CO₂/año entre 1985 y 1995 (Macedo, 1998). También por el alto contenido de oxígeno en el etanol, su combustión es más completa que la de la gasolina, por lo que emite menos monóxido de carbono (Cordovés, 2001). Por otro lado, la combustión de la gasolina y el diesel emiten compuestos aromáticos, muchos de los cuales son cancerígenos, así como otras impurezas, tales como octazufre, dicloro, compuestos órgano-metálicos, hidrocarburos sin combustionar, óxidos de nitrógeno y compuestos orgánicos volátiles (Bailey, 1996).

El uso del etanol como combustible automotor puede ayudar a disminuir la emisión neta de dióxido de carbono a la atmósfera ya que es utilizado en el proceso de fotosíntesis en las plantas del cual es obtenido. Esto induce a un ciclo donde se reduce la acumulación neta de dióxido de carbono y por lo tanto se atenúa el efecto invernadero (Galbe, 1994; Macedo, 1998). Los recursos de biomasa a ser considerados son fundamentalmente desechos agrícolas, agroindustriales y forestales, por lo que su transformación en etanol sería ventajoso, pues se produciría un combustible beneficioso al medio ambiente y se eliminarían residuos que de otra manera constituyen problemas de disposición (Grohman *et al.*, 1994; Grohman *et al.*, 1998).

1.1.5. Competencia entre biocombustible y la alimentación humana

La búsqueda de alternativas no competitivas con los alimentos es una necesidad para garantizar la seguridad alimentaria de la humanidad, por lo que algunos materiales de desecho han tenido prioridad en las investigaciones para la obtención de etanol (Prasad *et al.*, 2007).

Habitualmente el etanol se ha producido por fermentación de materias primas azucaradas y amiláceas, entre las materias primas azucaradas más utilizadas están la caña de azúcar, la remolacha azucarera y el sorgo dulce, mientras que son diversas las materias primas amiláceas utilizadas, tales como el maíz, el trigo, la papa, la yuca y el arroz (Tahezadeh y Karimi, 2007a). Esas materias primas constituyen importantes fuentes de alimentos y su disponibilidad no es suficiente para cubrir la demanda potencial de etanol combustible y la alimentación humana al mismo tiempo (Claassen *et al.*, 1999; Pimentel, 2001).

1.2. Materiales lignocelulósicos

Los materiales lignocelulósicos son la fuente renovable más abundante en la superficie de la tierra, lo cual los hace una materia prima atractiva para la producción de bioetanol. Sin embargo, estos materiales ofrecen una gran resistencia al ataque biológico y químico, debido precisamente a su alta complejidad en su composición y estructura química (Schurz, 1997). Los materiales lignocelulósicos están formados por tres componentes principales: celulosa, hemicelulosas y lignina. Entre las principales materias primas lignocelulósicas se encuentran los cultivos energéticos, el papel reciclado, los residuos forestales, los desechos agrícolas e industriales, así como los residuos sólidos urbanos (Martín, 2002). Sin embargo, solamente entre el 3 y el 4 % de esos materiales son utilizados económicamente en el mundo occidental, fundamentalmente como alimentos, en la producción de pulpa y papel, y en la generación de energía (Galbe, 1994).

1.2.1. Composición de los materiales lignocelulósicos (MLC)

Los MLC en general, están formados por tres componentes principales: celulosa, hemicelulosas y lignina. Además de poseer extractivos y cenizas.

Tabla 1.2.1a. Composición de materiales lignocelulósicos (%) (Martín y Obolenskaja, 1988; Noa *et al.*, 1991; Gastón *et al.*, 2000; Banerjee y Pandey, 2002).

Componentes	% en masa
Celulosa	36-51
Hemicelulosa	15-30
Lignina	20-25
Extractivos	3-4
Cenizas	0-1

La celulosa es el componente principal de las paredes celulares de las plantas superiores. El contenido de celulosa varía entre 36 y 51% de la masa seca. El contenido de hemicelulosas por su parte varía entre 15 y 30% de la masa seca, y la lignina desde 20 a un 25% del material seco. El contenido de extractivos no suele ser superior a 3-4%. Mientras que las cenizas solo alcanzan el 1% en la mayoría de los materiales.

Los extractivos son principalmente ácidos resínicos, compuestos fenólicos, aceites esenciales, ácidos grasos, grasas, ceras, compuestos fenólicos, hidrocarburos, taninos, colorantes, alcoholes cíclicos, sales hidrosolubles, mono- y disacáridos, alcaloides, almidón, arabinogalactano, pectinas, etc. (Martín, 2002).

1.2.2. Celulosa.

La celulosa es el principal componente de los MLC. Aproximadamente 36-51% de la materia seca en la mayoría de las especies vegetales es celulosa, a excepción del algodón que es celulosa casi pura.

1.2.2.1. Estructura molecular.

La celulosa es un homopolisacárido compuesto por unidades de β -D-glucopiranosas unidas por enlaces glicosídicos (1-4) (Fig. 1.2.2.1a).

Aunque la estructura química de la celulosa es conocida al detalle, muchos aspectos de su estado supramolecular, incluyendo la estructura cristalina y fibrilar aún no han sido completamente explicados. La masa molecular exacta, la polidispersión de la celulosa nativa y las dimensiones de las microfibrillas son problemas que todavía no han sido resueltos totalmente (Yúfera, 2002).

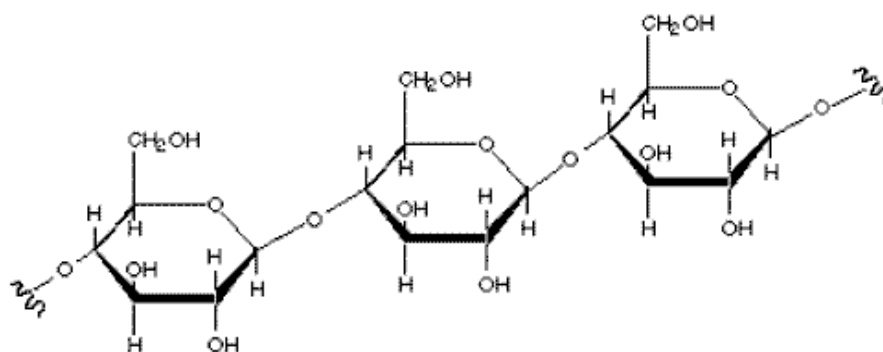


Fig. 1.2.2.1a. Estructura de la celulosa.

Esto hace que las moléculas se agreguen formando microfibrillas, en las regiones altamente organizadas (cristalinas) alternadas con regiones menos ordenadas (amorfas) (Fig. 1.2.2.1b). Las microfibrillas tienen entre 2 y 20 nm de diámetro y entre 100 y 40 000 nm de longitud (Yúfera, 2002).



Fig. 1.2.2.1b. Representación de la estructura fibrilar de la celulosa.

Las zonas oscuras corresponden a regiones cristalinas y las zonas claras corresponden a regiones amorfas. Las microfibrillas forman fibrillas y finalmente las fibras de celulosa. Como consecuencia de su estructura fibrosa y de los fuertes enlaces por puente de hidrógeno, la celulosa tiene una gran resistencia a la tensión y es insoluble en la mayoría de los disolventes. El comportamiento físico y químico de la celulosa es completamente distinto al del almidón, lo que demuestra claramente la influencia de las características estereoquímicas. Al igual que la celulosa, la fracción amilosa del almidón está formada por unidades de D-glucopiranosas unidas por enlaces glicosídicos (1-4), pero estas

unidades son anómeros α . La estructura cristalina de la celulosa ha sido caracterizada por análisis de difracción de rayos X y por métodos basados en la absorción de la radiación infrarroja polarizada. Se ha confirmado que todas las cadenas en las microfibrillas de celulosa nativa están orientadas en la misma dirección, o sea son paralelas (Yúfera, 2002).

Hay dos tipos de enlaces por puente de hidrógeno dentro de cada cadena de celulosa: del O(6) en un residuo de glucosa al O(2)H en la glucosa adyacente (O6...H-O2') y también del O(3)H al átomo de oxígeno del anillo (O3-H...O5') (Fig. 1.2.2.1c). Además, se forman enlaces por puente de hidrógeno intermoleculares: del O (3) en una cadena al O(6)H en la otra (O6-H...O3). O sea, cada residuo de glucosa forma dos enlaces por puentes de hidrógeno.

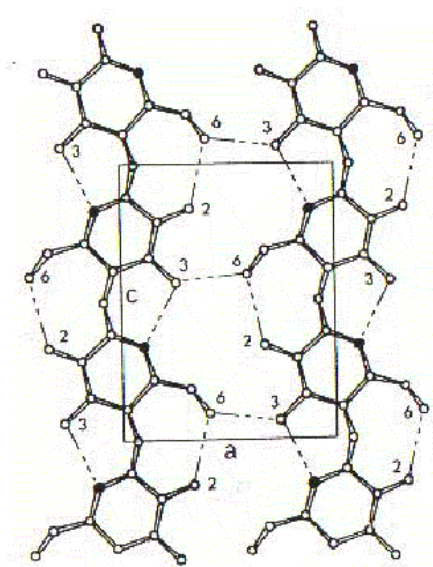


Fig. 1.2.2.1c. Proyección de la celulosa nativa mostrando la red de enlaces por puentes de hidrógeno.

La celulosa regenerada tiene cadenas antiparalelas. Los enlaces por puente de hidrógeno intra- e intermoleculares son los mismos que en la celulosa nativa, pero existen además otros dos tipos de enlaces entre una cadena angular y una cadena central. Estos enlaces unen las posiciones O(2) en una cadena con O(2)H en otra cadena y O(3)H con O(6). La celulosa regenerada se forma cuando el enrejado de la celulosa nativa es destruido, por ejemplo por hinchamiento con álcalis fuertes o por disolución. Como la celulosa regenerada, fuertemente enlazada (por enlaces por puente de hidrógeno), es termodinámicamente más estable que la celulosa nativa, no ocurre la reconversión (Yúfera, 2002).

1.2.2.2. Propiedades poliméricas de la celulosa

Las propiedades poliméricas de la celulosa generalmente se estudian en disolución. Sobre la base de las propiedades de la disolución, se puede llegar a conclusiones sobre el peso molecular promedio, la polidispersión y la conformación del polímero. Sin embargo, el aislamiento de la celulosa de la madera incluye el riesgo de que ocurra cierta degradación, obteniéndose fracciones con menor masa molecular (Rowell, 2005).

Las determinaciones experimentales dan un valor promedio de masa molecular y algunos métodos dan una distribución de esta. Para un sistema polidisperso, esos valores promedio difieren en dependencia del método usado. La masa molecular promedio numérica M_n^* puede ser determinada usando osmometría o por determinación del número de grupos reductores terminales. La masa molecular relativa promedio $M_r(X)$, puede ser deducida a partir de datos de dispersión de la luz. Los datos de equilibrio de sedimentación obtenidos por ultrafiltración dan los valores llamados M_z . Por último, M_v se refiere a la masa molecular basada en mediciones de viscosidad (Rowell, 2005).

Para la celulosa la relación entre el grado de polimerización y la masa molecular es $DP = M/162$, donde 162 es la masa molecular de una unidad de anhidroglucosa.

Las determinaciones de la masa molecular han mostrado que la celulosa del algodón en su estado nativo tiene unos 15 000 residuos de glucosa, mientras que la celulosa nativa de la madera contiene unos 10 000 residuos de glucosa.

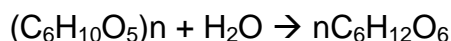
1.2.3. Reacciones químicas de la celulosa

Las reacciones químicas de la celulosa tienen un gran significado práctico, pues permiten la obtención de una amplia variedad de derivados de importancia económica.

1.2.3.1. Hidrólisis de la celulosa

La celulosa puede hidrolizarse en presencia de ácidos minerales fuertes en condiciones severas (ácido concentrado a temperatura ambiente o ácido diluido a temperaturas elevadas) o por la acción de enzimas celulolíticas. Durante la hidrólisis ocurre la ruptura de los enlaces glicosídicos entre las unidades de

glucosa con la consecuente disminución del grado de polimerización. La hidrólisis total de la celulosa conduce a la formación de D-glucosa:



Debido a su estructura supramolecular, la celulosa es un polisacárido difícilmente hidrolizable. La hidrólisis ocurre principalmente en los sectores amorfos y transcurre a través de la formación de diferentes intermediarios:

Celulosa → Hidrocelulosa → Celodextrinas → Oligosacáridos → Celobiosa → Glucosa

Si la hidrólisis es catalizada por ácidos concentrados a temperatura ambiente, el proceso solo llega hasta la formación de oligosacáridos y celodextrinas, debido a la insuficiencia de agua. Para completar la hidrólisis es necesario diluir y calentar la mezcla de reacción (Chum *et al.* 1985).

1.2.3.2. Determinación de la celulosa

Para la determinación de la celulosa contenida en los MLC es necesario eliminar los extractivos, la lignina y las hemicelulosas, los extractivos se eliminan por extracción con disolventes adecuados. La eliminación de la lignina (deslignificación) se basa en la mayor facilidad de oxidación de este componente en comparación con los polisacáridos o en las reacciones de sustitución características de los compuestos aromáticos. La separación de las hemicelulosas se basa en su mayor facilidad de hidrólisis en comparación con la celulosa o en su capacidad de disolverse en disoluciones alcalinas diluidas (Rowell, 2005).

Método de la cloración: El material lignocelulósico, previamente tratado con disolventes orgánicos para la eliminación de los extractivos, es tratado secuencialmente con dicloro en presencia de agua y con disolución acuosa caliente de sulfito de sodio. Este tratamiento conduce a la cloración y oxidación de la lignina; los productos obtenidos se disuelven en la disolución de sulfito de sodio. Las hemicelulosas se hidrolizan sólo parcialmente, por lo que hay que introducir una corrección a la celulosa obtenida (Rowell, 2005).

Método nitro-alcohólico: El material lignocelulósico es tratado con una mezcla de ácido nítrico y etanol en una proporción 1:4 a ebullición. La lignina se nitra y se oxida, las hemicelulosas se hidrolizan y las sustancias extractivas se eliminan con el etanol durante el tratamiento (Rowell, 2005).

El método más exacto de determinación de la celulosa consiste en la eliminación de las sustancias extractivas, seguida de la deslignificación por cloración y oxidación, por tratamiento con clorito de sodio (NaClO_2) o con ácido paracético. En estas condiciones la holocelulosa se conserva intacta, para la obtención de la celulosa pura, se eliminan las hemicelulosas por tratamiento con disolución acuosa de hidróxido de sodio (Rowell, 2005).

1.2.4. Lignina

La lignina es el principal componente no-carbohidrato de la madera. Es el polímero aromático más abundante en la naturaleza y representa entre el 20 y 25% de la materia seca en las maderas duras y entre un 26-32% en las maderas blandas. Algunas maderas duras tropicales pueden tener contenidos de lignina superiores al 30%. A diferencia de los polisacáridos, la lignina no es una sustancia individual sino una mezcla de polímeros aromáticos. Los eslabones estructurales de la lignina son unidades de fenilpropano, además, la lignina no presenta una estructura regular y sus unidades estructurales están unidas por distintos tipos de enlaces, lo que las diferencia de otros biopolímeros como los polisacáridos y proteínas. Aunque muchos aspectos de la química de la lignina aún no se conocen completamente, los principales elementos estructurales han sido aclarados como resultado de estudios detallados de preparaciones de lignina aislada (Hendricks *et al.*, 2009).

Para estudiar la estructura y las propiedades de la lignina es necesario aislarla de la materia lignocelulósica en un estado lo más cercano posible a su estado natural. La lignina natural es una red polimérica tridimensional y no se disuelve en ningún disolvente, para disolver la lignina es necesario romper su enrejado espacial, por eso las preparaciones de lignina en disolución son solamente fragmentos de la red original con un elevado grado de ramificación. En la pared celular de la madera, la lignina se encuentra unida mecánica- y químicamente con los carbohidratos. La lignina, conjuntamente con las hemicelulosas unidas a ella, forma la matriz amorfa en la cual se encuentra confinada la armazón de las microfibrillas de celulosa, esto dificulta el aislamiento de la lignina, para la destrucción del enrejado de la lignina y sus enlaces con las hemicelulosas es necesario utilizar catalizadores ácidos. Como la lignina es muy sensible a

tratamientos químicos, incluso en condiciones suaves, siempre se transforma durante el aislamiento (Zohreh, 2008).

La lignina de maderas blandas puede ser determinada gravimétricamente por el método de Klason, la lignina de maderas duras se disuelve parcialmente durante la hidrólisis ácida, por lo que los valores gravimétricos deben ser corregidos por un factor de lignina soluble en ácido.

Se han desarrollado métodos de espectroscopía UV para la determinación de la lignina tanto en madera como en pulpas.

Desde los años cuarenta se llegó a la conclusión de que la lignina está formada por unidades de fenilpropano. Las unidades de fenilpropano que forman la lignina varían en dependencia del tipo de madera. Los monómeros de la lignina son las unidades p-hidroxifenílicas derivadas del alcohol p-cumarílico en las plantas herbáceas (gramíneas), las unidades guayacílicas derivadas del alcohol coniferílico en las maderas blandas y las unidades siringílicas derivadas del alcohol sinapílico en las maderas duras (Fig. 1.2.3.1a). La lignina de maderas blandas está formada casi exclusivamente por unidades guayacílicas (Fig. 1.2.3.1b), la lignina de maderas duras contiene en mayor proporción unidades siringílicas, pero también presenta unidades guayacílicas (Rowell, 2005).

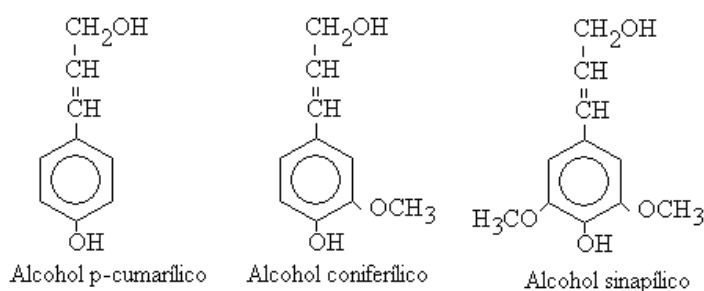


Fig. 1.2.3.1a. Precursores de la lignina en gramíneas y en maderas blandas y duras

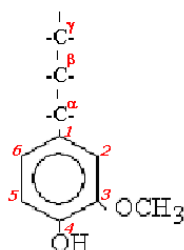


Fig. 1.2.3.1b. Unidad guayacílica componente de la lignina de maderas blandas

1.2.4.1. Grupos funcionales

Como la reactividad de la lignina depende de los grupos funcionales presentes, se requiere de información confiable sobre estos. Aunque los métodos químicos continúan siendo importantes, la determinación de los grupos funcionales en la lignina se realizan por medio de métodos espectroscópicos (UV, IR, ^1H NMR y ^{13}C NMR).

A diferencia de los polisacáridos, los grupos funcionales de la lignina son más variados. Al igual que sus precursores, los polímeros de lignina contienen grupos metoxilo, hidroxilo y algunos grupos carbonilo terminal (aldehído) en las cadenas laterales. El contenido de grupos metoxilo en una preparación de lignina sirve de criterio sobre la transformación ocurrida durante su aislamiento. Los grupos hidroxilos son los más importantes en las reacciones químicas de la lignina, y se dividen en fenólicos y alcohólicos. La mayoría de los hidroxilos fenólicos no están libres, sino combinados a través de alguno de los enlaces característicos con la unidad de fenilpropano vecina. Especialmente las unidades siringílicas de la lignina de maderas duras se encuentran extensamente esterificadas. Los grupos hidroxilos alcohólicos pueden ser primarios (en posición γ) y secundarios (en posición α). Estos últimos son muy reactivos, especialmente cuando existe un hidroxilo fenólico en estado libre, debido a que forman partículas intermediarias altamente reactivas tanto en medio ácido como en medio alcalino. Los grupos hidroxilos alcohólicos aparecen con frecuencia esterificados con ácido p-hidroxibenzoico y con ácido p-hidroxicinámico.

Los grupos carbonilos pueden existir como función aldehído (en la posición γ) y como función cetona (en las posiciones α y β). Además de estos grupos, también existen dobles enlaces (α - β) y grupos carboxilo (en la posición γ) (Rowell, 2005).

1.2.4.2. Estructura de la lignina

La lignina no es una sustancia individual por lo que es imposible representar su estructura mediante una fórmula. No obstante, tomando como base la información obtenida en los estudios de biosíntesis, así como en el análisis de

los varios tipos de enlaces y de grupos funcionales se han construido fórmulas estructurales para la lignina.

En la Fig. 1.2.3.1c se muestra la fórmula propuesta por Adler para la lignina de maderas blandas. Esta fórmula consiste en 16 unidades de fenilpropano y representa solamente un segmento de la macromolécula de lignina. Desde luego, un modelo de tan limitado tamaño no puede dar un panorama estrictamente cuantitativo. Por ejemplo, la incorporación de una unidad siringílica en la fórmula solo tiene un significado cualitativo, pues en realidad el contenido de ese tipo de unidades en la lignina de maderas blandas es extremadamente bajo (alrededor de 1%).

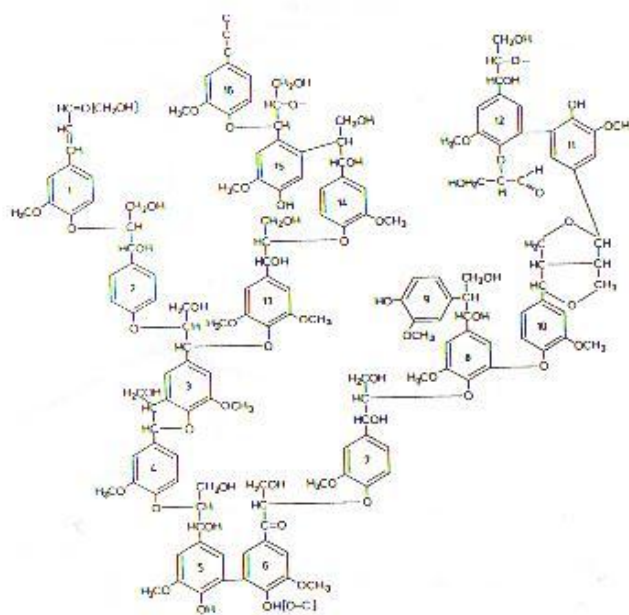


Fig. 1.2.3.1c. Segmento estructural de la lignina de coníferas propuesto por Adler.

1.2.4.3. Reacciones de la lignina

La variedad de grupos funcionales existentes en la lignina hace que esta sea muy reactiva. Las reacciones siguen las generalidades de las reacciones de los compuestos orgánicos. No obstante, en la lignina, al igual que en otros polímeros, es posible la ocurrencia simultánea de varias reacciones de diferentes tipos. Las reacciones macromoleculares de destrucción y de condensación son competitivas, la destrucción hidrolítica tiene lugar solamente en enlaces de tipo éter, pero no ocurren en enlaces de tipo C-C, cuya ruptura es posible solamente durante la destrucción térmica de la lignina (Yúfera, 2002).

1.2.4.4. Reacciones de destrucción hidrolítica y de condensación

La destrucción hidrolítica de los enlaces β -O-4 ocurre tanto en medio ácido como en medio alcalino (Fig. 1.2.4.1d). El grupo hidroxilo fenólico que se forma en el carbono 4 del anillo bencénico como resultado de esta reacción, activa al grupo hidroxilo alcohólico de la posición α de la cadena lateral, lo que propicia la participación de este último en reacciones de condensación. Durante la condensación se forman nuevos enlaces C-C α -5, lo que conduce a un aumento de la masa molecular de la lignina y a una disminución de su reactividad y solubilidad. Las reacciones de condensación y de destrucción son competitivas porque ambas son propiciadas por las mismas condiciones: medio ácido o alcalino y altas temperaturas.

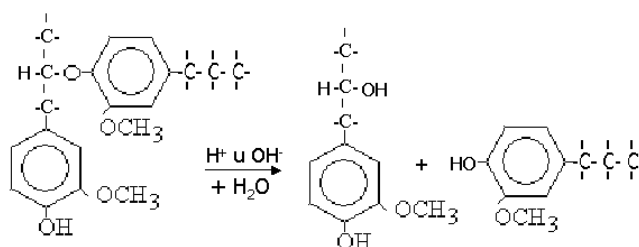


Fig. 1.2.4.1d. Reacción de destrucción hidrolítica de la lignina

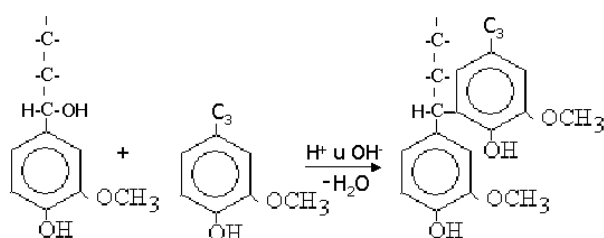


Fig. 1.2.4.1d. Reacción de condensación de la lignina

En condiciones severas, por ejemplo durante la hidrólisis de los polisacáridos de la madera con ácido sulfúrico concentrado, las reacciones de condensación de la lignina predominan sobre las reacciones de destrucción. En condiciones más suaves, por ejemplo durante el tratamiento de la madera con disolventes orgánicos (etanol o dioxano) en presencia de pequeñas cantidades de agua o ácido clorhídrico concentrado las reacciones de destrucción de la lignina predominan sobre las reacciones de condensación (Mosier *et al.*, 2005).

1.2.5. Hemicelulosas

En contraste con la celulosa, que es un homopolisacárido lineal, las hemicelulosas son heteropolisacáridos ramificados. Las hemicelulosas, al igual que la celulosa son material de soporte en las paredes celulares. Las hemicelulosas se hidrolizan fácilmente por ácidos con formación de sus azúcares componentes, los cuales son D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, D-xilosa, L-arabinosa y pequeñas cantidades de L-ramnosa, y de los ácidos D-glucurónico y 4-O-metil-D-glucurónico y D-galacturónico. El grado de polimerización de las hemicelulosas es de sólo 200 (Balat *et al.*, 2008).

El contenido de hemicelulosas en la materia seca de la madera es generalmente entre 20 y 30%. La composición y estructura de las hemicelulosas es diferente en maderas duras y blandas. También existen diferencias considerables en el contenido y características de las hemicelulosas en el tronco, ramas, corteza y raíces.

1.2.5.1. Hemicelulosas de las maderas blandas

Los galactoglucomananos son las principales hemicelulosas de las maderas blandas (representan alrededor de un 20%). Presentan un esqueleto lineal o ligeramente ramificado formado por unidades de β -D-glucopiranososa y β -D-manopiranososa unidas por enlaces (1-4) (Fig. 1.2.5.2a)(Chum *et al.*, 1985).

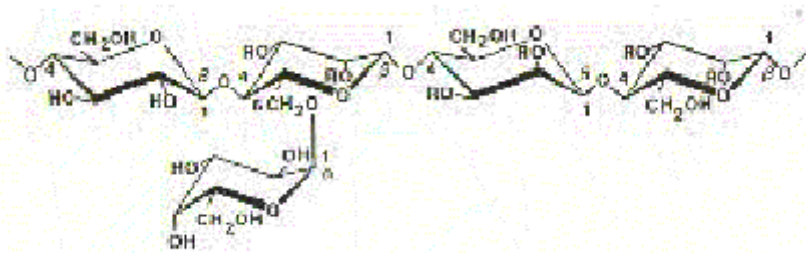


Fig. 1.2.5.2a. Estructura principal del galactoglucomanano

Los galactoglucomananos se pueden dividir en dos fracciones con diferentes contenidos de galactosa. La fracción con bajo contenido de galactosa presenta una proporción de galactosa: glucosa: manosa de aproximadamente 0.1:1:4, mientras que la fracción rica en galactosa tienen una proporción de 1:1:3. La primera fracción frecuentemente es nombrada glucomanano. Los residuos de α -galactopiranososa se encuentran en forma de cadenas laterales de una sola unidad, unidos a la cadena principal por enlaces (1-6). Los grupos hidroxilo en

las posiciones C2 y C3 en la cadena principal están parcialmente sustituidos por grupos O-acetilo. Los galactoglucomananos son fácilmente depolimerizados por la acción de los ácidos. El enlace entre la unidad de galactosa y la cadena principal es el que se hidroliza con mayor facilidad. Los grupos acetilo son mucho más fáciles de hidrolizar por álcalis que por ácidos. Además de los galactoglucomananos, las maderas blandas también poseen arabinoglucuronoxilanos (5-10%), están formados por una cadena principal de unidades de β -D-xilopiranosas unidas por enlaces (1-4), las posiciones C2 están parcialmente sustituidas por ácido 4-O-metil- α -D-glucurónico en un promedio de dos residuos por cada 10 unidades de xilosa. Además, por cada 10 unidades de xilosa existen 1.3 residuos de α -L-arabinofuranosa (Fig. 1.2.5.2b). (Hendricks *et al.*, 2009)

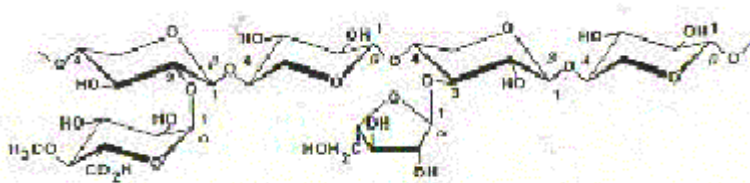


Fig. 1.2.5.2b. Estructura principal del arabinoglucuronoxilano

Este polisacárido es muy abundante (5-35%) en la madera de lárice, sin embargo es poco común en otras maderas blandas. Su esqueleto principal está formado por unidades de β -D-galactopiranosas unidas por enlaces galactosídicos (1-3). Prácticamente cada unidad está sustituida por una ramificación de β -D-galactopiranosas (1-6) y también por algunos residuos de L-arabinosa y de unos pocos residuos de ácido glucurónico. El arabinogalactano es poco viscoso y muy soluble en agua debido a su estructura ramificada.

Además de los galactoglucomananos, arabinoglucuronoxilanos y arabinogalactanos, las maderas blandas contienen otros polisacáridos presentes en cantidades menores. Entre esos polisacáridos se incluyen el almidón (compuesto por amilosa y amilopectina) y las sustancias pépticas.

Las unidades más comunes de los polisacáridos pépticos son residuos de ácido D-galacturónico, L-arabinosa y L-ramnosa. Aunque las sustancias

pépticas normalmente no son clasificadas como hemicelulosas, esta distinción es difícil y más o menos arbitraria.

1.2.6. Extractivos

Por sustancias extractivas (o sencillamente extractivos) se conoce una gran variedad de componentes vegetales que pueden ser separados de la madera por extracción con disolventes neutrales (agua a disolventes orgánicos). El contenido de extractivos en maderas de climas templados no suele ser superior de 3-4%, pero en algunas especies tropicales supera el 40%. Además, el contenido de extractivos es diferente en distintas partes del árbol, por ejemplo la corteza contiene más extractivos que la madera y las gramíneas, generalmente contienen más extractivos que la madera. Los extractivos, aunque generalmente representan una fracción pequeña, comprenden un número extraordinariamente grande de compuestos individuales tanto lipofílicos como hidrofílicos. (Rowell, 2005)

Los extractivos son constituyentes no estructurales de la madera, ya que son casi exclusivamente compuestos extracelulares y de baja masa molecular con la excepción de algunos polisacáridos. Estos compuestos están presentes en los exudados que se forman en los árboles como respuesta al daño mecánico o al ataque por insectos u hongos. El color y el olor de la madera están determinados por la presencia de sustancias extractivas.

Diferentes tipos de extractivos son necesarios para mantener las diversas funciones biológicas del árbol. Por ejemplo, las grasas constituyen la fuente de energía de las células vegetales, mientras que los terpenoides inferiores, los ácidos resínicos y las sustancias fenólicas protegen el árbol contra el daño microbiano o los ataques de los insectos (Rowell, 2005).

Aunque no es muy preciso, el término resinas con frecuencia se usa como nombre colectivo para los extractivos lipofílicos, los cuales son solubles en disolventes orgánicos apolares e insolubles en agua.

La determinación cuantitativa de los extractivos en maderas y pulpas se lleva a cabo por métodos estandarizados después de la extracción con disolventes orgánicos, tales como hexano, diclorometano, éter dietílico, acetona, etanol o mezclas de estos. En la identificación de componentes individuales son muy

eficaces los métodos de cromatografía líquida en combinación con espectroscopía de masas. El aislamiento de todos los componentes individuales de los extractivos del material lignocelulósico en estado puro es prácticamente imposible. En dependencia del disolvente utilizado y del método de extracción los extractivos se clasifican en: sustancias volátiles con vapor (también conocidas como volátiles o como aceites esenciales), a este grupo pertenecen los terpenos y terpenoides; solubles en disolventes orgánicos (resinas): ácidos resínicos, ácidos grasos, grasas, ceras, compuestos fenólicos, hidrocarburos, etc.; solubles en agua (fría o caliente): taninos, colorantes, alcoholes cíclicos, sales hidrosolubles, mono- y disacáridos, alcaloides, almidón, arabinogalactano, pectinas, etc. (Rowell, 2005).

Algunos extractivos hidrosolubles se disuelven parcialmente en disolventes orgánicos. El contenido de los grupos antes mencionados depende no sólo de la especie de material lignocelulósico sino también del disolvente empleado y del procedimiento seguido para la extracción. Generalmente, la madera no contiene muchas sustancias hidrosolubles, aunque los taninos y el arabinogalactano están presentes en altas concentraciones en algunas especies. Sin embargo, el arabinogalactano no es considerado extractivo sino hemicelulosas (Rowell, 2005).

Los extractivos tienen importancia para aplicaciones técnicas y constituyen una materia prima muy valiosa para la producción de sustancias orgánicas. Además, juegan un papel importante en los procesos de pulpeo y de fabricación de papel.

1.3 Métodos de pretratamientos de los materiales lignocelulósicos

Existen diferentes tipos de pretratamientos, que se utilizan para hacer más accesible la celulosa a las enzimas en algunos casos y en otros persiguen como fin el fraccionamiento del material en sus diferentes componentes, entre los cuales se encuentran métodos químicos, físicos, biológicos o combinaciones de estos (Bjerre et al., 1996).

1.3.1 Métodos físicos

Las operaciones mecánicas de cortado, molienda y triturado pueden reducir el tamaño de partícula de los materiales lignocelulósicos para aumentar el área de superficie de contacto, reducir el grado de polimerización y disminuir la cristalinidad de las fibras, lo que facilita el acceso de las enzimas y aumenta la reactividad de la celulosa (Sánchez *et al.*, 2008). Sin embargo, los métodos mecánicos no son muy atractivos por su alto consumo energético y costos capitales. Los requerimientos energéticos para estas operaciones dependen del tamaño de partícula necesario y de las características de la biomasa (Sun y Cheng, 2002; Sánchez *et al.*, 2008). Otra limitación de los métodos mecánicos es que no eliminan la lignina ni las hemicelulosas, y como consecuencia de esto se producen inhibidores para los procesos subsiguientes (Jiang *et al.*, 2007; Bak *et al.*, 2009).

1.3.2 Métodos físico-químicos

La explosión con vapor es un método físico-químico que da buenos rendimientos en un corto tiempo y minimiza el uso de reactivos químicos (Gregg y Saddler, 1996). Consiste en un calentamiento del material con vapor saturado seguido de una descompresión explosiva. Durante el calentamiento, los grupos acetilo de las hemicelulosas se hidrolizan y el ácido acético formado cataliza la hidrólisis de las hemicelulosas, por lo que este método también se conoce como autohidrólisis. El agua sobrecalentada atrapada en el interior de las células se evapora cuando la presión del reactor es disminuida bruscamente, de este modo ocurre la disrupción de la estructura celular debido a la presión interna generada por la evaporación instantánea, lo que conlleva al ablandamiento del material fibroso (Puri y Pearce, 1985).

Otro método es la utilización de agua caliente en estado líquido (LHW, Liquid Hot Water). En este método, el cual no requiere del uso de reactivos, las hemicelulosas se solubilizan en forma de oligosacáridos y la fracción celulósica es fácilmente hidrolizable (Mosier *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2007).

Es importante el control del pH, la temperatura y el tiempo de reacción para mejorar la digestibilidad enzimática del material (Mosier *et al.*, 2005). Este método ha dado buenos resultados para el bagazo de caña, llegando a superar a la explosión con vapor en cuanto al rendimiento de azúcares y a la

disminución de la formación de inhibidores (Schuman *et al.*, 1999; Laser *et al.*, 2002).

La explosión con amoníaco, AFEX (Ammonia Fiber Explosion), es un pretratamiento físico-químico en el cual el material es expuesto al amoníaco líquido a 90-100°C durante unos 30 minutos y luego la presión es reducida bruscamente. La AFEX mejora la hidrólisis enzimática y minimiza la formación de inhibidores de la fermentación (Chundawat *et al.*, 2007), pero es poco efectiva en materiales con alto contenido de lignina y se requiere de la recirculación del amoníaco (Sun y Cheng, 2002; Eggeman y Elander, 2005).

Otro método parecido es la explosión con dióxido de carbono (CO₂), la cual también opera a bajas temperaturas por lo que se evita la degradación de los azúcares (Dale y Moreira, 1982). La explosión con CO₂ es menos costosa que la explosión con amoníaco (NH₃) (Zheng *et al.*, 1998).

1.3.3. Métodos químicos.

La biomasa lignocelulósica es muy diversa, incluye la Madera, residuos forestales, yerbas, arbustos, residuos de jardinería y residuos agrícolas entre otras, siendo una fuente de energía renovable, almacenando la energía en los enlaces químicos (McKendry, 2002). Esta fuente de materia prima puede ser procesada químicamente para romper los enlaces químicos y transformar esta energía en biocombustibles, tales como el biodiesel, el bioetanol y el biogás. Una alternativa prometedora es convertir esta abundante biomasa lignocelulósica en bioetanol mediante la hidrólisis enzimática, sin embargo para romper la estructura compleja de las paredes celulares de las células vegetales y hacer accesible la celulosa a las enzimas es necesario aplicar algún método de pretratamiento (Chang y Holtzapple, 2000).

Existen diversos métodos químicos para el tratamiento de los materiales lignocelulósicos, entre ellos se encuentran la hidrólisis ácida, hidrólisis básica y la utilización de disolventes. Los métodos de pretratamiento han sido desarrollados para mejorar la accesibilidad de las enzimas a la celulosa (Moiser *et al.*, 2005).

Un método de pretratamiento potencial es el pulpeo organosolv basado en el uso de disolventes orgánicos como los alcoholes y los ácidos orgánicos, para solubilizar la lignina y una parte de hemicelulosas (Puls, 1993; Muurinen, 2000).

Aunque ese método ha sido principalmente de interés por la industria de la pulpa, se ha demostrado que produce una celulosa relativamente pura y muy reactiva hacia la hidrólisis enzimática (Araque *et al.*, 2008).

Los pretratamientos organosolv permiten adecuar la celulosa a la acción de las enzimas mediante el uso de disolventes orgánicos que solvolyzan y solubilizan la lignina y parte de las hemicelulosas (Itoh *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2006). Estos métodos consisten en el calentamiento de la lignocelulosa con sistemas acuosos de disolventes orgánicos a temperaturas entre 150-200°C. Entre los disolventes estudiados están los de baja temperatura de ebullición (etanol y metanol) y los de alta temperatura de ebullición (etilenglicol, alcohol tetrahidrofurfurílico y glicerol), así como otras clases de compuestos orgánicos como ácido acético, dimetilsulfóxido o fenoles (Chum *et al.*, 1985). Los pretratamientos organosolv permiten obtener una lignina relativamente pura como subproducto (Sun y Cheng, 2002). Los disolventes usados deben ser reciclados para reducir el costo operacional y para evitar la inhibición de la hidrólisis enzimática y de la fermentación (Sun y Cheng, 2002). Entre los métodos organosolv los más eficientes en los procesos de deslignificación de la madera y otros materiales lignocelulósicos han sido los que utilizan oxácidos como disolvente orgánico. Han sido probados experimentalmente diversos sistemas organosolv en los últimos años, sin embargo sólo un pequeño grupo de ellos ha mostrado una alta selectividad y eficiencia. Los procesos organosolv que utilizan ácido acético y ácido fórmico como disolventes han mostrado buenos resultados en la deslignificación de los materiales lignocelulósicos. Cuando se utiliza ácido acético como agente deslignificante catalizado con ácido clorhídrico el proceso se llama acetosolv; si se utiliza ácido fórmico en un medio catalizado se le denomina proceso formacell y sin catalizador acetocell. Estos tres procesos parecen ser los más prometedores para alcanzar una completa utilización de los materiales lignocelulósicos con un impacto ambiental mínimo. Con la utilización de estos procesos en condiciones suaves se puede remover la lignina y las hemicelulosas con una degradación no significativa de la celulosa (Ligero *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2006). El método acetosolv ha sido aplicado exitosamente en maderas duras, blandas y en otros materiales lignocelulósicos (Ligero *et al.*, 2008). En el proceso acetosolv los materiales lignocelulósicos de cualquier procedencia pueden ser fraccionados

en pulpa, lignina y hemicelulosas o productos de degradación de estos, siendo posible su utilización en la producción de productos de alto valor agregado (Xu *et al.*, 2006). El proceso acetosolv ha sido aplicado en la deslignificación de la biomasa de marabú con buenos resultados, obteniéndose pulpas ricas en celulosa y un alto grado de recuperación de la lignina (Venkata *et al.*, 2011; Rodríguez, 2011).

El proceso acetosolv presenta ventajas respecto a otras tecnologías utilizadas en la deslignificación de los materiales lignocelulósicos, ya que bajo condiciones suaves de operación se pueden alcanzar altos rendimientos de lignina y hemicelulosas removidas en un proceso de un solo paso y la pulpa obtenida presenta buenas características. La celulosa puede ser recobrada en la pulpa, mientras que parte de las hemicelulosas son hidrolizadas. Este es un factor importante en el análisis económico del proceso acetosolv. La fracción de hemicelulosas es convertida en productos comerciables como azúcares y furfural, en proporciones que dependen de la severidad del proceso. En condiciones drásticas el furfural (intermediario químico utilizado en la síntesis de los polímeros alcohol furfúrico y tetrahidrofurano) es el subproducto principal derivado de las hemicelulosas. La pulpa puede ser usada en la producción de derivados de la celulosa, tales como carboximetilcelulosa, celofán, acetato de celulosa, papel y combustibles. La fracción de lignina disuelta puede ser fácilmente precipitada de los licores de acetosolv mediante la adición de agua, separándola por filtración de las hemicelulosas. La lignina puede ser convertida en productos de alto valor agregado tales como fibra de carbón, carbón activado, adhesivos y plásticos. Las desventajas del proceso acetosolv están dadas por la corrosión causada por el ácido clorhídrico contenido en el medio y la esterificación de la celulosa con ácido acético, obteniéndose una pulpa con alto contenido de grupos saponificables (Xu *et al.*, 2006). La oxidación húmeda es el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos con agua y aire u oxígeno a temperaturas por encima de 120°C (Schmidt y Thomsen, 1998). El oxígeno participa en las reacciones de degradación incrementando la liberación de ácidos orgánicos y permite la operación a temperaturas relativamente más bajas. La oxidación húmeda está entre los procesos más simples en términos de equipamiento, energía y

reactivos químicos requeridos (Chum *et al.*, 1985). Es un método apropiado para materiales con bajo contenido de lignina ya que los rendimientos decrecen con el aumento del contenido de ésta, unido a que una buena parte de la lignina se oxida y solubiliza. Una ventaja de la oxidación húmeda es la baja formación de aldehídos furánicos (Bjerre *et al.*, 1996) y fenólicos (Klinke *et al.*, 2002).

La prehidrólisis con ácido sulfúrico diluido es otro método efectivo, entre cuyas ventajas se encuentran la recuperación de las hemicelulosas en forma de monosacáridos y la posibilidad de recuperar la lignina pura después de la hidrólisis. Su principal inconveniente es el alto costo de los materiales anticorrosivos requeridos para la construcción de los reactores (Mosier *et al.*, 2005b).

La ozonólisis involucra el gas ozono en la separación de la lignina y las hemicelulosas. Este método es eficaz bajo condiciones suaves y es medioambientalmente factible, ya que el ozono no deja residuos debido a su corta vida media. Sin embargo, la gran cantidad de ozono requerida para su utilización en pretratamientos químicos lo hace costoso (Caldwell, 2006)

.

1.3.3.1. Tratamiento organosolv con glicerol

El principio del método está basado en el uso del glicerol como disolvente orgánico por su capacidad de disolver la lignina. El material lignocelulósico se mezcla con el disolvente, y eventualmente con agua, y se calienta a temperaturas entre 150 y 200°C, o algo más bajas si se emplea un catalizador, por el tiempo requerido. En este método, además de la lignina, también las hemicelulosas se solubilizan en cierto grado, con lo que la fracción sólida se enriquece en celulosa, la cual resulta activada para la hidrólisis enzimática. Los informes en los procesos de organosolv con alcohol se han basado principalmente en el tratamiento con metanol o etanol, mientras otros alcoholes han llamado menos la atención debido a sus costos relativamente altos. Por otro lado, los métodos organosolv están a menudo limitados por el riesgo de los funcionamientos de presión alta y el uso de disolventes volátiles e inflamables. El glicerol es un compuesto orgánico con una alta temperatura de ebullición, además se obtiene como subproducto en grandes cantidades en el proceso de producción de biodiesel por lo que es una buena opción para el proceso

organosolv, pero hasta ahora sólo se ha investigado para unos pocos materiales lignocelulósicos como algunas maderas blandas (Demirbas, 2007) y paja de trigo (Sun y Cheng, 2007; Sun y Chen, 2008).

1.3.3.2. Hidrólisis alcalina

La hidrólisis alcalina puede ser utilizada como método de pretratamiento de los materiales lignocelulósicos, su efecto deslignificante depende del contenido de lignina del material pretratado (McMillan, 1994; Sun y Cheng, 2002). El mecanismo de la hidrólisis alcalina está relacionado con la saponificación de los enlaces éster intermoleculares que unen a los xilanos de las hemicelulosas con los demás componentes (lignina y celulosa). La porosidad de los materiales lignocelulósicos aumenta con la eliminación de estos enlaces (Sun y Cheng, 2002). El tratamiento con disolución diluida de hidróxido de sodio crea porosidad y túneles que aumenta la superficie de contacto del material, disminuye su grado de polimerización, disminuye su cristalinidad, elimina los enlaces estructurales de la lignina con los carbohidratos rompiendo la estructura de la lignina (Fan *et al.*, 1987; Sun y Cheng, 2002). Este método no es recomendable para materiales con un contenido de lignina superior al 26 %, aunque en materiales con más de un 20 % de lignina disminuye su efecto (Sun y Cheng, 2002).

1.4. Hidrólisis enzimática

Debido a los inconvenientes de la hidrólisis ácida, durante los últimos años se le ha dedicado especial atención a la hidrólisis enzimática, la cual se lleva a cabo utilizando celulasas, fundamentalmente de hongos del género *Trichoderma* (Tahezadeh y Karimi, 2007b). La producción de las enzimas es una etapa crucial del proceso de conversión de la lignocelulosa en etanol, ya que el costo de estas representa hasta el 23% del costo de producción del etanol (Nguyen, 1993). La hidrólisis enzimática de la celulosa consiste en la adsorción de la celulasa sobre la superficie de la celulosa, la biodegradación de la celulosa en azúcares fermentables y la desorción de la celulasa (Tahezadeh y Karimi, 2007b). El pH y la temperatura son factores que influyen en el proceso de hidrólisis enzimática, parámetros controlables con la adición de un buffer adecuado en el primer caso y la utilización de incubadoras para controlar

la temperatura (Tengborg *et al.*, 2001). La alta concentración de sustrato disminuye la velocidad de conversión, afectando el mezclado y la transferencia de masa (Sun y Cheng, 2002). La adición de enzimas debe estar en el rango entre 5 y 35 % (Börjesson *et al.* 2007). La hidrólisis enzimática presenta una serie de ventajas sobre la hidrólisis ácida, es un método selectivo, con un mayor rendimiento y sin el inconveniente de la formación de productos colaterales. Además, el consumo de energía es menor (Galbe, 1994), las principales limitaciones de la hidrólisis enzimática son el alto costo de las enzimas (Saddler, 1993; Taherzadeh y Karimi, 2007b) y el requerimiento de grandes reactores debido a la lentitud de la reacción (Olsson, 1994; Taherzadeh y Karimi, 2007b).

1.5. Marabú (*Dichrostachys cinerea*)

El marabú (*Dichrostachys cinerea* L.), perteneciente a la familia *Fabaceae* y la subfamilia *Mimosoideae*, es una especie nativa de África y del sudeste asiático. Desde el siglo XIX fue introducida en Cuba, así como en el sur de Estados Unidos, La Española y en las Antillas Menores (Moyroud, 2000).

En Cuba se conoce por distintos nombres comunes como marabú, aroma, aroma francesa, aroma blanca, espina del diablo y Weyler. Es un arbusto que alcanza alturas máximas de 4-5 m. Excepcionalmente en suelos propicios y húmedos llega a 10 m de altura y hasta 18 cm de diámetro. Sus troncos son tortuosos, con numerosas ramificaciones muy espinosas que suelen formar entramados impenetrables. Este arbusto se expande rápidamente por las deyecciones del ganado que consume sus legumbres. Resulta muy difícil de eliminar porque sus largas raíces son capaces de originar numerosos retoños dondequiera que emerjan a la superficie del suelo formando tupidas espesuras. Esto se debe a que no tiene aquí las plagas y enfermedades que frenan su desarrollo en sus lugares de origen, así como a su tolerancia a suelos diversos y a la sequía (Moyroud, 2000; Wakeling *et al.*, 2007).

A pesar de su enorme impacto ambiental negativo en Cuba, el marabú resulta útil en algunos aspectos, debido a que protege grandes áreas de suelos desprovistos de vegetación natural contra la erosión. Sirve como refugio para especies nativas de la fauna afectadas por especies depredadoras introducidas o por la caza furtiva. Es de alguna utilidad como planta apícola, es fuente de

alimento proteico para el ganado, especialmente el ovino-caprino. Su madera es muy dura, duradera, inmune al ataque de hongos e insectos, de alta densidad, y textura fina. Es utilizada para cercas, construcciones rústicas y ebanistería. Por su alto poder calórico se utiliza como leña y para la fabricación de carbón. Se calcula que con maquinaria y el consumo de una tonelada de petróleo pueden cortarse 800 toneladas de biomasa (que equivalen a la energía de 267 a 400 t de petróleo), en 13.43 ha, en un turno de trabajo (Méndez y Ramos, 2004).

El control por consumo intensivo del ganado puede ser un complemento del control por otros métodos. La erradicación del marabú resulta tan trabajosa y costosa que muy a menudo las tierras invadidas son abandonadas por los productores (Moyroud, 2000; Wakeling *et al.*, 2007).

Son extensas las áreas que ocupa el marabú en nuestro país contribuyendo a la generación de una gran cantidad de biomasa, enriqueciendo sus potencialidades como fuente de materia prima considerable en la producción de etanol celulósico. Recientemente se demostró que el marabú presenta altos contenidos de celulosa y lignina, y cantidades considerables de hemicelulosas, además de sustancias extractivas y minerales (Soudham *et al.*, 2011; Rodríguez, 2011). Los estudios realizados demuestran la eficiencia económica de las biorrefinerías lignocelulósicas que combinen la producción de combustibles con otros productos químicos y además genere energía eléctrica (Wyman, 2003). No obstante, se ha estimado que en las biorrefinerías modernas el 40% de la lignina resultante de los procesos hidrolíticos de los polisacáridos bastaría para satisfacer los requerimientos energéticos del proceso (Mabee *et al.*, 2006). El restante 60% podría dirigirse a la obtención de distintos productos de alto valor agregado (Sannigrahi *et al.*, 2010). A partir de la lignina del marabú pueden obtenerse plásticos verdes, materiales adhesivos, dispersantes y emulsificantes. La lignina puede ser utilizada para la producción de compuestos aromáticos importantes y de alta demanda como son el fenol y sus derivados, el benceno, tolueno y xileno (Bozell *et al.*, 2007).

1.6. Conclusiones parciales.

- Los materiales lignocelulósicos son una fuente de materia prima con alto contenido de carbohidratos y de gran potencialidad para la producción de etanol.
- El marabú por su composición química y abundancia en los campos de Cuba, puede ser utilizado como materia prima potencial en la producción de bioetanol.
- Con la aplicación del pretratamiento organosolv con glicerol se puede lograr la solubilización de una considerable cantidad de lignina contenida en la materia prima.
- Una deslignificación adicional eliminaría en gran medida el contenido de lignina en la materia prima.

Capítulo 2: Materiales y métodos

2.1. Etapas de la investigación

El trabajo experimental tuvo lugar en el laboratorio del Grupo de Tecnología de Biorrecursos, del Departamento de Química e Ingeniería Química de la Universidad de Matanzas.

La primera etapa de la investigación comprendió la caracterización físico-química de la materia prima (*Marabú*). Todas las determinaciones de esta caracterización fueron realizadas teniendo en cuenta los Métodos estándar para el Análisis de Biomasa lignocelulósica, perteneciente a los Laboratorios Nacionales de Energía Renovable de los EEUU (NREL).

La segunda etapa consistió en el pretratamiento de la biomasa de Marabú con glicerol prefijando los valores de temperatura, tiempo de reacción y la concentración del disolvente, resultados obtenidos en investigaciones anteriores (Martin *et al.*, *inédito*), así como la caracterización físico-química del material pretratado.

La tercera etapa del trabajo experimental consistió en la deslignificación alcalina con hidróxido de sodio del marabú pretratado sobre la base de un diseño de experimentos de superficie de respuesta, con compuesto central, con tres factores y a tres niveles, modelado por el software Statgraphics Plus 5.0 y la caracterización físico-química de cada fracción.

2.1.1. Materia prima

Las muestras de tallos de marabú (*Dichrostachys cinerea*), recolectadas en zonas agrícolas de la provincia de Matanzas, fueron cortadas, molidas, secadas al aire durante una semana y en estufa a 50⁰C durante 48 h. Posteriormente, el material seco fue tamizado en zaranda vibratoria (VEB MLW Labortechnik ILMENAU IHVR-2, Alemania) para obtener una fracción con un tamaño de partícula de 1 mm, la cual fue utilizada para el análisis de la composición química, y otra fracción de 2 mm, que fue utilizada en los tratamientos. Ambas fracciones fueron homogenizadas para garantizar una composición idéntica en todas las alícuotas del material, y conservadas en bolsas plásticas con el objetivo de mantener una humedad constante.

2.2. Caracterización de la materia prima

La materia prima fue analizada químicamente para determinar el contenido de humedad, cenizas, extractivos, lignina de Klason, hemicelulosas como polisacáridos fácilmente hidrolizables (PFH) y la celulosa como polisacáridos difícilmente hidrolizables (PDH) e hidrólisis ácida analítica (HAA). Los contenidos de humedad, cenizas, extractivos y lignina de Klason fueron determinados mediante los protocolos del *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) de los EE.UU. (Sluiter *et al.*, 2008 a-d). Los polisacáridos fácilmente y difícilmente hidrolizables fueron determinados por una modificación del método reportado por Bazarnova (2002). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

2.2.1 Determinación de la humedad

La determinación de la humedad fue realizada por lo planteado en el “*Standard Method for Determination of Total Solids in Biomass*” de los NREL. Procedimiento analítico de laboratorio 001 (Sluiter *et al.*, 2008a). Este Método Standard se basa en el análisis gravimétrico por volatilización indirecta.

Sobre la base de este método se sigue el siguiente procedimiento: se pesó exactamente 1.0000 g de la muestra, la cual fue colocada en estufa a 105°C (AISET® YLD-6000 P\G2007ba, R.P. China), se pesó nuevamente y es repetida la operación hasta obtener un peso constante (hasta que en dos pesadas consecutivas se obtuvo diferencias de no más de 0.2 mg). Posteriormente se enfrió en desecadora con cloruro de calcio anhidro y silicagel, se pesó en una balanza analítica digital Sartorius BS 124 S. Max 120g, con una precisión de 0.1mg, China). El contenido de humedad se determinó mediante la siguiente expresión:

$$H = \frac{MRMH - MRMS}{MRMH - MRS}$$

Donde:

H: humedad.

MRMH: masa del recipiente con la muestra húmeda.

MRMS: masa del recipiente con la muestra seca.

MRS: masa del recipiente seco.

2.2.2. Determinación de Cenizas

La determinación de cenizas fue realizado por lo planteado en el “*Standard Method for Ash in Biomass*” de los NREL. Procedimiento analítico de laboratorio 005 (Sluiter *et al.*, 2008b). Este Método Standard para el Análisis de Biomasa lignocelulósica se basa en el análisis gravimétrico, el cual establece el siguiente procedimiento: en un crisol de porcelana de masa conocida se introdujo 1.0000 g de muestra. Se le dió tratamiento térmico en un horno mufla (AISET YLD-6000, Alemana de 0.1°C de sensibilidad) a una temperatura de $575 \pm 25^{\circ}\text{C}$ por espacio de tres horas, se pesó nuevamente y se repitió la operación hasta obtener peso constante (hasta que en dos pesadas consecutivas se obtuvo diferencias de no más de 0.2 mg). Para conseguir una combustión lenta y controlada del material se introdujo en la mufla a baja temperatura ($100\text{-}150^{\circ}\text{C}$), incrementándola a intervalos de 50°C , hasta 575°C . Posteriormente se enfrió en desecadora y se pesó en balanza analítica digital (Sartorius BS 124 S. Max 120g, con una precisión de 0.1mg, China). El contenido de cenizas se determinó mediante la siguiente expresión:

$$CC = \frac{MRC - MRS}{(MRMH - MRS) * (1 - H)} * 100$$

Donde:

CC: contenido de cenizas.

H: humedad.

MRMH: peso del recipiente con la muestra húmeda.

MRMS: peso del recipiente con la muestra seca.

MRS: masa del recipiente seco.

MRC: masa del recipiente con las cenizas.

2.2.3 Determinación de sustancias extractivas

La determinación de los extractivos fue realizada según lo planteado en el “*Standard Method for the Determination of Extractives in Biomass*” de los NREL. Procedimiento analítico de laboratorio 010 (Sluiter *et al.*, 2008d). Este Método Standard se basa en el análisis gravimétrico, por extracción sólido-líquido. El cual establece el siguiente procedimiento: se pesaron 3g de muestra, asegurándose que fuera representativa de la porción entera del material.

Cuidadosamente se agregó la muestra al dedal para la extracción. Se colocó el mismo en un aparato Soxhlet y se utilizaron 150 mL de etanol al 95% en volumen como disolvente. Se realizó la extracción a reflujo durante 24 horas en baño termostatado (Midingen / Sitz Freital, Alemania), verificando la proporción calorífica, para dar de 4 a 5 ciclos por hora. Se realizaron aproximadamente de 100 a 120 ciclos durante las 24 horas. Finalizada la extracción, se retiró el dedal y se lavó la muestra con etanol 95 % en volumen. El balón, conteniendo el etanol y los extractos, se llevó a un rotoevaporador (IKA RV 05 Basic. Baño de agua, IKA HB4 Basic, Alemania), recuperándose el etanol por evaporación a vacío, a $45 \pm 5^\circ\text{C}$. Se enfrió en desecadora con cloruro de calcio anhidro y silicagel y se pesó en balanza analítica digital (Sartorius BS 124 S. Max 120g, con una precisión de 0.1 mg, China). El contenido de extractos se determina mediante la siguiente expresión:

$$CE = \frac{MRMS - MRS}{MMH * (1 - H)} * 100$$

Donde:

CE: contenido de extractos.

H: humedad de la muestra.

MRMH: masa del recipiente con la muestra húmeda.

MRMS: masa del recipiente con la muestra.

MRS: masa del recipiente seco.

2.2.4. Determinación de polisacáridos fácilmente hidrolizables (PFH)

La determinación de los PFH se realiza según lo planteado por *Leononzh y Obolenskaia en 1988*. Este método se basa en el análisis gravimétrico por solubilización de las hemicelulosas. El cual sigue el siguiente procedimiento: se pesaron 2.0000 g de biomasa libre de extractos en balanza analítica digital (Sartorius BS 124 S. Máx. 120g, con una precisión de 0.1 mg, China). Se añadió en un balón con boca esmerilada y fondo redondo de 100 mL de capacidad, al que se le adicionaron 20 mL de ácido clorhídrico al 5 % en masa y se agitó cuidadosamente por espacio de 30 minutos. Se reflujo durante tres horas en baño termostatado (Midingen / Sitz Freital, Alemania) a una temperatura de 100°C . Transcurrido este tiempo se filtró a vacío, con bomba

(ILMVAC 400171, China). El residuo sólido o torta se secó en estufa-incubadora digital con control térmico (AISET YLD-6000, Alemania de 0.1°C de sensibilidad) por espacio de 24h a 105°C y se enfrió en desecadora con cloruro de calcio anhidro y silicagel. El contenido de polisacáridos fácilmente hidrolizables se determinó mediante la siguiente expresión:

$$PFH = \frac{(m_o - m_f)}{m_o} * 100$$

Donde:

m_o : masa inicial de la muestra.

m_f : masa del residuo.

2.2.5. Determinación de polisacáridos difícilmente hidrolizables (PDH)

Los residuos de la determinación de los PFH fueron pesados e introducidos en vasos de precipitado de 100 mL. A cada vaso se adicionó 15 mL de ácido sulfúrico al 72% en masa, y la mezcla se mantuvo durante 2 h a temperatura ambiente con agitación periódica. Posteriormente, la mezcla fue transferida a un balón de 500 mL, se le adicionó 135 mL de agua destilada y se reflujo durante 2 h en un baño de agua (Midingen / Sitz Freital, Alemania). Finalmente, la mezcla se enfrió y se filtró a vacío (Bomba ILMVAC 400171, Alemania). El residuo de la filtración se secó a 105°C durante 24 h, se enfrió y pesó. El contenido de PDH se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$PDH = \frac{m_2 - m_3}{m_o} * 100$$

Donde:

m_o , masa inicial de la muestra,

m_2 , masa inicial del residuo de la determinación de PFH,

m_3 , masa final del residuo de este proceso.

El contenido de PDH también fue determinado a partir de los azúcares reductores totales en el filtrado.

2.2.6. Determinación de hidrólisis ácida analítica (HAA) y lignina de Klason

La lignina de Klason se determina como el residuo de la hidrólisis ácida analítica a las muestras de biomasa (Sluiter *et al.*, 2008 c). Muestras de 0.5 g de biomasa libre de extractivos se mezclaron en un tubo de ensayo con 5 mL de ácido sulfúrico al 72%, y se hidrolizaron por una hora en baño de agua (Midingen / Sitz Freital, Alemania) a 30°C. A continuación, la mezcla se transfirió a un frasco roscado de 250 mL, y el ácido sulfúrico se diluyó hasta alcanzar el 4% en masa mediante la adición de agua destilada. Los frascos con las mezclas se colocaron en una autoclave (Advantage AL02-03-100, China) a 121±3°C por una hora. Posteriormente, el contenido de los frascos se filtró a vacío (Bomba ILMVAC 400171, Alemania) a través de vasos filtrantes con tamaño de poro número 3, y el filtrado fue colectado y guardado a 4°C para la posterior determinación de los carbohidratos. Los vasos filtrantes, con el residuo sólido, fueron secados a 105±3°C durante 24 h, enfriados en una desecadora, y pesados en balanza analítica (Sartorius BS 124 S. Max 120g, con una precisión de 0.1mg, China). El contenido de lignina de Klason se calculó por la siguiente expresión:

$$CLK = \frac{MRMS - MRS}{MMH * (1 - H)} * (100 - CE)$$

Donde:

CLK: contenido de lignina de Klason.

CE: contenido de extractos.

H: humedad de la muestra.

MRMH: masa del recipiente con la muestra húmeda.

MRMS: masa del recipiente con la muestra.

MRS: masa del recipiente seco.

2.2.7. Determinación de azúcares reductores totales (ART)

La determinación de los azúcares reductores totales se realizó según lo planteado por *Miller, 1959*. Este método se basa en un análisis colorimétrico. El cual sigue el siguiente procedimiento: la determinación se realiza utilizando ácido 3,5 dinitrosalicílico como desarrollador de color. Se prepararon patrones

de glucosa a 0.1, 0.25, 0.4, 0.6, 0.7, y 1.0 mg/mL de concentración, se realizaron las lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 546 nm en un espectrofotómetro (Zuzi UV-4200, España), para la confección de una curva de calibración. El contenido de ART se determinó contra la curva patrón y los resultados son expresados en g / L. Teniendo en cuenta la dilución apropiada para el hidrolizado objeto de análisis, se toman 0.5 mL de la misma y se sitúan en un tubo de ensayo, seguidamente se le adiciona 0.5 mL del reactivo desarrollador de color (ácido 3.5- dinitrosalicílico), y se pone en baño de agua termostataado (Midingen / Sitz Freital, Alemania) a 100 °C por 10 min. A continuación se deja que la solución alcance la temperatura ambiente y se le adicionan 1.2 mL de agua destilada, posteriormente se leyó en el espectrofotómetro (Zuzi UV-4200, España) a una longitud de onda de 546 nm. Los valores obtenidos se ajustaron por mínimos cuadrados y se obtuvo la ecuación mejor ajustada a los valores experimentales mediante la cual se calcularon las concentraciones de las muestras problemas.

2.3. Pretratamiento organosolv con glicerol

Como método de deslignificación se utilizó un pretratamiento organosolv, utilizando glicerol como disolvente orgánico. El pretratamiento organosolv se realizó a 170°C empleando como agente deslignificante una disolución acuosa de glicerol al 60% en masa y una relación líquido–sólido de 10:1. Este tratamiento tuvo lugar en un reactor (REGMED HB-51, Brasil) a escala de banco con un tiempo de reacción de 1h. A la torta, fracción sólida obtenida tras aplicar el pretratamiento se le realizó la siguiente caracterización: por ciento de humedad, rendimiento de pulpa, PFH, PDH, HAA y contenido de lignina; mientras que al licor, fracción líquida, se le determinó el volumen obtenido, el contenido de ART antes y después de la post-hidrólisis ácida. También se determinó el porcentaje de lignina solubilizada y recuperada por precipitación de los licores.

2.3.1. Parámetros de caracterización físico-química para las materias sólidas obtenidas en el pretratamiento organosolv

En la caracterización físico-química de los materiales sólidos para el pretratamiento organosolv se tuvo en cuenta el por ciento de humedad y los principales componentes de los MLC: la celulosa, hemicelulosas, lignina,

extractivos y cenizas. Todos éstos materiales y métodos fueron descritos en el epígrafe 2.2.

2.3.2. Parámetros de caracterización físico-química para los licores producidos por el pretratamiento organosolv con glicerol

En la caracterización de los licores producidos por el pretratamiento organosolv se tuvo en cuenta medir el pH y los contenidos de azúcares reductores totales (ART). Además, se realizó la precipitación química de la lignina mediante cambio de disolvente con agua, para recuperar la misma de los licores para investigaciones posteriores.

2.3.3. Precipitación química de la lignina en los licores obtenidos por pretratamiento organosolv con glicerol

Para precipitar la lignina solubilizada en el licor obtenido en el pretratamiento con glicerol al 60 % se realizó un diseño de experimentos factorial categórico, con un solo factor (tipo de disolvente: agua y etanol), a dos niveles (uno y dos volúmenes de disolvente). El procedimiento que se realizó se describirá a continuación: se añadió 10mL de licor y 10 mL de disolvente (1:1) o 20mL de disolvente (1:2), el experimento fue realizado en un tubo de centrifuga previamente pesado, posteriormente se refrigeró por 24horas; cumplido este tiempo, se centrifugó por un intervalo de 10 min a 10000 rpm (Heal Force Neofuge 15R, China), el líquido sobrenadante se decantó y guardó. El residuo sólido se lavó con agua incorporándole el volumen inicial para su centrifugación. El líquido decantado se desechó y se procedió a lavar el residuo. Esta operación se repite nuevamente. Los tubos de centrifuga se secaron a 50⁰C por espacio de 24 horas, posteriormente se enfrió en desecadora y se pesó para determinar masa de lignina recuperada.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Los resultados experimentales fueron procesados estadísticamente usando los programas *Microsoft Excel 2007* y *STATGRAPHICS Plus versión 5.0 para Windows*. Para cada resultado se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Se comprobó la significación de las diferencias observadas entre distintos parámetros.

2.4. Diseño estadístico en la etapa de deslignificación adicional

La deslignificación adicional con hidróxido de sodio al material obtenido del pretratamiento con glicerol al 60% fue realizada aplicando un diseño de experimentos de superficie de respuesta compuesto central, de tres factores y tres niveles. Los factores con sus niveles corresponden a la temperatura (80-100-120°C), tiempo (60-90-120 min) y concentración (0.5-1.25-2%). Las variables de respuestas que se utilizaron fueron el contenido de lignina, de hemicelulosas como polisacáridos fácilmente hidrolizables, así como, el contenido de celulosa como polisacáridos difícilmente hidrolizables.

Tabla 2.4. Sumario de las condiciones experimentales usadas para la deslignificación adicional con hidróxido de sodio.

N ^o	Tiempo (min)	Temperatura. (°C)	Concentración. (%)
1	90	100	2.5
2	40	100	1.25
3	90	100	1.25
4	120	120	2
5	120	120	0.5
6	140	100	1.25
7	90	100	1.25
8	90	100	0
9	60	80	2
10	60	80	0.5
11	60	120	0.5
12	120	80	0.5
13	90	130	1.25
14	60	120	2
15	90	66	1.25
16	120	80	2

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Los resultados experimentales fueron procesados estadísticamente usando los programas *Microsoft Excel 2007*. Para cada resultado se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Se comprobó la significación de las diferencias observadas entre distintos parámetros.

2.4.1. Precipitación química de la lignina en los licores obtenidos por pretratamiento alcalino adicional

La precipitación química de la lignina se realizó según lo planteado por *Sluiter et al.2008*. Siguiendo el siguiente procedimiento: en la deslignificación adicional con NaOH del marabú pretratado con glicerol al 60%, se obtuvo un filtrado donde su mayor contenido es lignina soluble a pH básico. Para lograr la precipitación de la misma se ajusta el pH (pH metro MV 88 con electrodo combinado, China) hasta alcanzar un valor de 2 con ácido clorhídrico de concentración de la cantidad de sustancia $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, homogenizando la solución con un agitador magnético (Bunsen. S.A, Alemania), a temperatura ambiente. Seguidamente, se coloca en baño de agua (Midingen / Sitz Freital, Alemán) a temperatura de 80°C durante una hora. Posteriormente, se filtra y se lava la lignina con abundante agua, hasta alcanzar pH neutro. Se seca y se pesa.

2.4.2. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática, la cual se lleva a cabo utilizando enzimas celulasas, fundamentalmente de hongos del género *Trichoderma* (epígrafe 1.4), las enzimas empleadas fueron la Celluclast 1.5 L con una actividad enzimática de 80 FPU/mL y Novozym 188.

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo en tubos de Eppendorf de 1.5 mL de capacidad, al los cuales se le adicionó 0.02 g de muestra en 940 μL de disolución tampón de citrato $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ para garantizar un pH de 4.8, se introdujo en una incubadora con agitación Vortemp 56 (Woodbridge, NJ, USA) a una temperatura de 50°C durante 10 minutos para garantizar una temperatura adecuada para las enzimas, a la temperatura recomendada se le adicionó 8 μL de Celluclast 1.5 L y 32 μL de Novozym 188 y se incubó a 50°C y 150 rpm durante 72 h. Al concluir el tiempo de reacción, se sacaron los tubos de la incubadora y dejándolos reposar durante 1 h a temperatura ambiente. Se tomaron 100 μL del líquido sobrenadante, del cual se tomó una porción para determinar la concentración de azúcares reductores totales y se conservó el resto en congelación.

Capítulo 3: Análisis de resultados

3.1. Caracterización de la materia prima

La composición química de la biomasa de marabú fue determinada para conocer su contenido de carbohidratos y lignina, los carbohidratos se determinaron como PDH, considerado en este trabajo como celulosa y como PFH considerado como hemicelulosas, no se determinaron en el trabajo los productos de degradación de los carbohidratos ni la lignina soluble en ácido por falta de condiciones para esas determinaciones en el laboratorio de Biorrecursos. Los resultados se muestran en la tabla 3.1.

El análisis químico de esta biomasa lignocelulósica muestra un alto contenido de carbohidratos, alrededor de 62% en masa, por lo que es un material lignocelulósico a considerar para la producción de etanol y otros productos derivados de la celulosa y las hemicelulosas tales como papel, celofán, acetato de celulosa, ácido láctico, ácido acético, furfural y xilitol, todos de alto valor comercial. El contenido total de carbohidratos obtenido en estos análisis son comparables con trabajos científicos realizados anteriormente con este material (Rodríguez, 2011; Venkata *et al.*, 2011), aunque es de señalar que difiere ligeramente en el contenido de celulosa y hemicelulosas, presentando esta muestra menor contenido de celulosa y mayor de hemicelulosas, aspecto que no difiere de otras fuentes consultadas que plantean que la composición de los materiales lignocelulósicos depende de la edad, la estación del año y otros factores externos (Obolenskaja, 1986).

Tabla 3.1. Composición química de la biomasa de marabú.

Componentes	Contenido (% másico)
Celulosa	30.97
Hemicelulosas	31.75
Lignina	29.20
Extractivos	5.63
Cenizas	2.45

El otro componente importante del marabú es la lignina con un 29.2 %, comparable con las fuentes consultadas (Rodríguez, 2011; Venkata *et al.*, 2011) y con el contenido de lignina de muchas maderas blandas, superando el contenido de lignina de los residuos agrícolas y de muchas maderas duras (Fengel y Wegener, 1989). El alto contenido de lignina demuestra el alto valor calórico del marabú por lo que parte de esta lignina pudiera utilizarse para satisfacer las demandas energéticas del proceso de fraccionamiento del mismo y el resto pudiera ser utilizado en la obtención de diversos productos derivados de la lignina y como fuente de derivados fenólicos.

El contenido de extractivos obtenido es comparable con el de muchos materiales lignocelulósicos y aunque aparentemente su contenido es bajo, estos se caracterizan por la diversidad de componentes químicos en su composición, los cuales pueden ser una fuente de materias primas de interés para la industria química, trabajo ya iniciado en la Universidad de Matanzas (Rodríguez *et al.*, inédito).

La caracterización composicional de las sustancias minerales es otra línea de interés para futuras investigaciones.

3.2. Pretratamiento con glicerol.

El sólido obtenido (torta) en las condiciones descritas anteriormente (epígrafe 2.3), se caracterizó químicamente para conocer su composición y valorar la efectividad del pretratamiento. Fue determinado el contenido de celulosa, hemicelulosas y lignina. Los resultados de la caracterización de la torta se muestran en la tabla 3.2.

Desde el punto de vista físico la torta muestra buenas características, el color es carmelita claro, lo que evidencia que las condiciones de pretratamiento no son muy drásticas y puede soportar otros pretratamientos adicionales como los previstos en esta investigación.

No se realizaron otras determinaciones físicas a la torta obtenida por considerarse que no es objetivo de esta investigación.

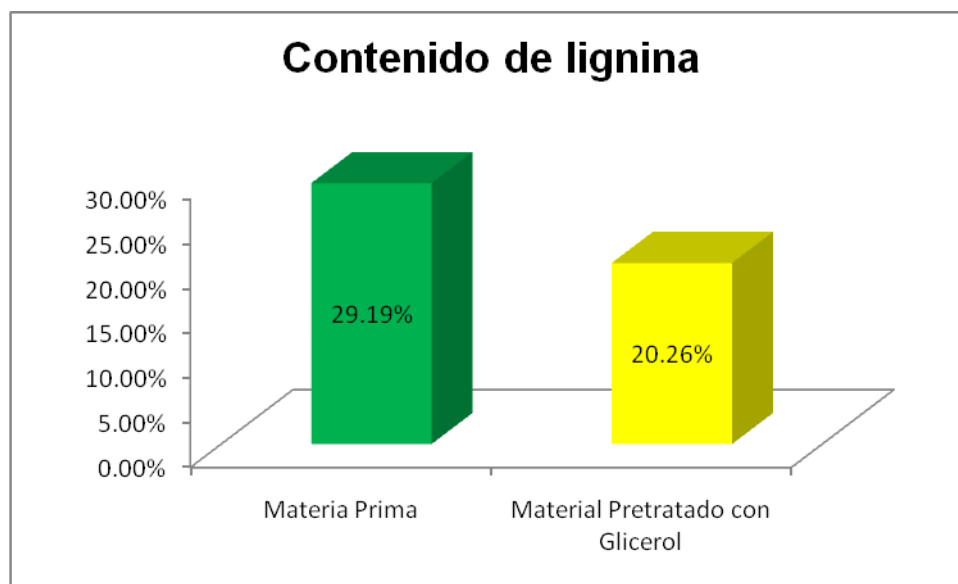
Tabla 3.2 Caracterización de la torta de marabú pretratada con glicerol.

Contenido	Materia Prima (% en masa)	Material pretratado (% en masa)
Lignina	29.2	20.26
Hemicelulosas	31.75	20.29
Celulosas	30.97	57.00

Como resultado del pretratamiento con glicerol una parte importante del material se solubilizó, obteniéndose un 74.67 % de rendimiento de sólidos, resultado notablemente inferior al 100 %. Los componentes solubilizados fueron fundamentalmente la lignina y las hemicelulosas, disminuyendo su contenido en ambos casos, aunque inferior a los resultados obtenidos con otros métodos aplicados a la misma materia prima, como es el método acetosolv (Rodríguez, 2011; Venkata *et al.*, 2011), lo que pudiera atribuirse a que las condiciones de deslignificación no fueron lo suficientemente severas como para solubilizar un máximo de lignina o a la ausencia de catalizador en el proceso de deslignificación. Por otro lado, la celulosa se preservó durante el pretratamiento, alcanzando un 57 % en la torta, aspecto importante a destacar, si se pretende aplicar una hidrólisis enzimática. Las figuras 3.2, 3.3, 3.4 muestran una comparación gráfica entre el contenido de los principales componentes de la materia prima (marabú) y la torta obtenida como resultado del pretratamiento con glicerol.

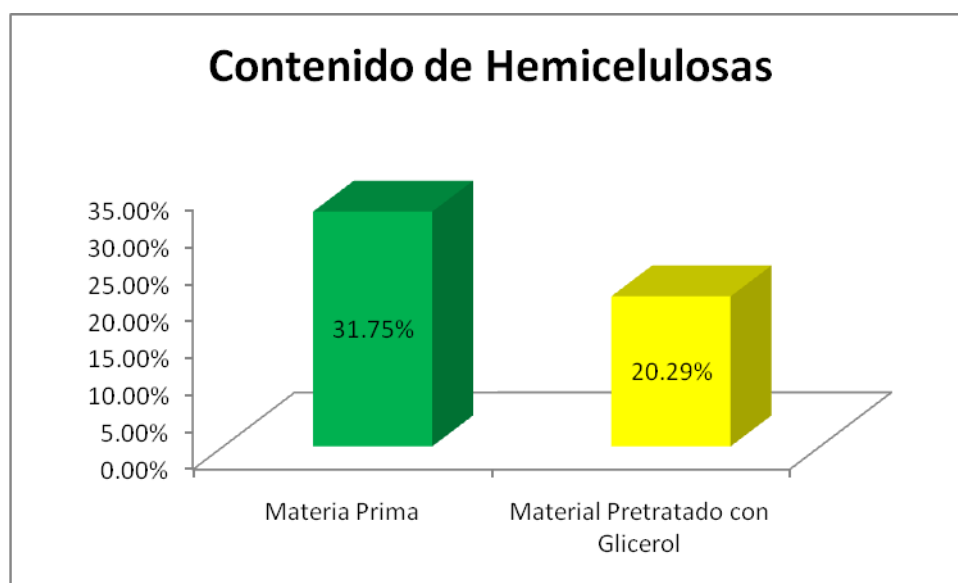
A pesar que las condiciones son consideradas no severas puede apreciarse claramente la disminución del contenido de lignina en el material pretratado lo que confirma que el glicerol puede ser utilizado como disolvente en el proceso de deslignificación y pulpeo de la biomasa de marabú en las condiciones de reacción antes expuestas (epígrafe 2.3).

Figura 3.2 Comparación entre la biomasa de marabú con y sin tratamiento con glicerol en cuanto a contenido de lignina



El pretratamiento organosolv con glicerol en las condiciones ya mencionadas también es capaz de solubilizar una buena parte de las hemicelulosas, en la figura 3.3 se muestra el contenido comparativo de este componente en la materia prima y en la torta obtenida.

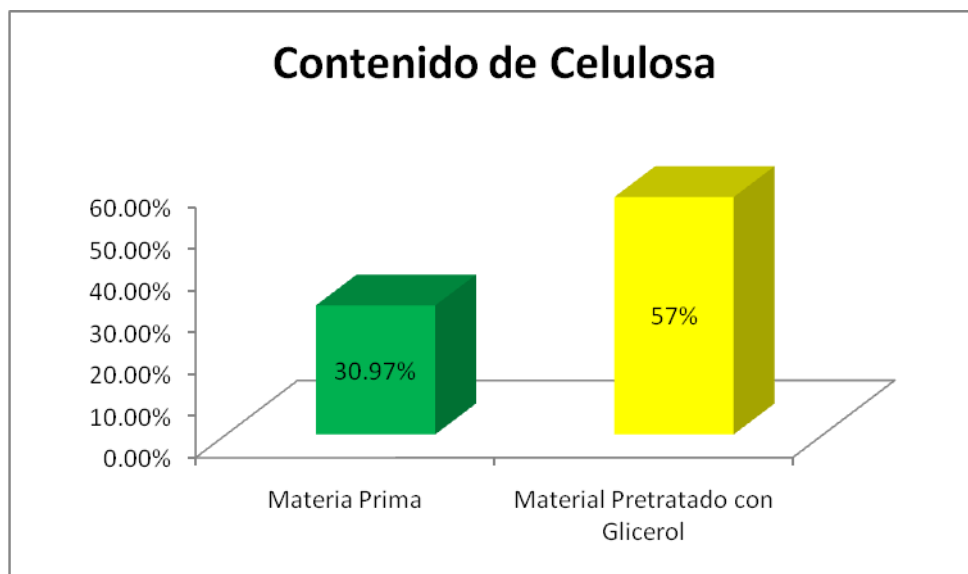
Figura 3.3. Comparación entre la biomasa de marabú con y sin tratamiento con glicerol en cuanto a contenido de hemicelulosas



Como resultado del pretratamiento con glicerol disminuye el contenido de hemicelulosas en la torta, obteniéndose un licor rico en lignina y hemicelulosas a partir del cual pudieran ser separadas.

Como resultado del pretratamiento organosolv, puede apreciarse de igual forma, la variación del contenido de celulosa en la torta (figura 3.4).

Figura 3.4. Comparación entre la biomasa de marabú con y sin tratamiento con glicerol en cuanto a contenido de celulosa.

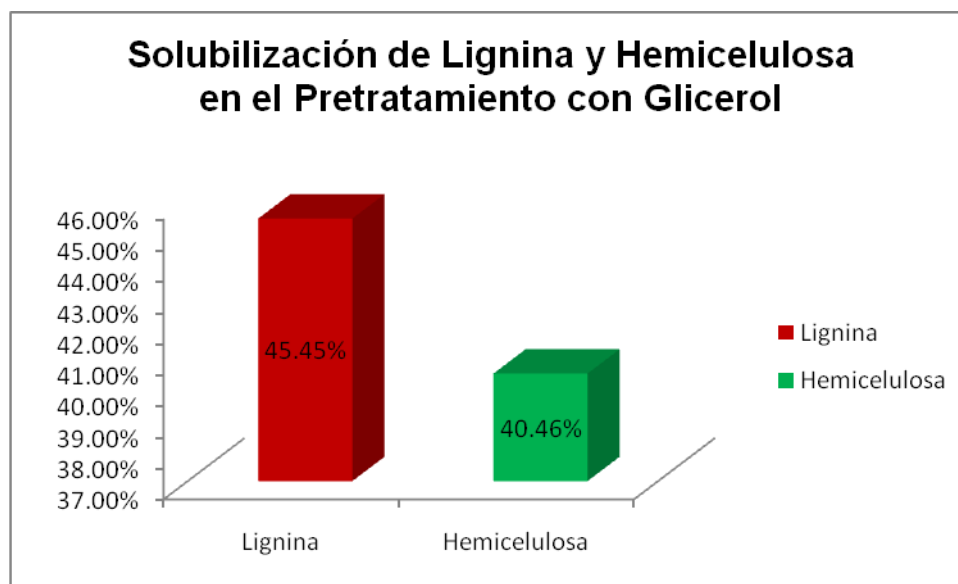


Como resultado de la solubilización de la lignina y las hemicelulosas se incrementó el contenido de celulosa en la torta (figura 3.4), obteniéndose un material con un 57 % de celulosa, casi el doble que en la materia prima (Tabla 3.2), por lo que este método puede ser considerado en el pulpeo de la biomasa de marabú.

Como resultado del balance de masa realizado pudo obtenerse con exactitud las cantidades de lignina y hemicelulosas solubilizadas durante el pretratamiento (figura 3.5).

Como puede apreciarse en la figura 3.5 el glicerol al 60 % en masa, a la temperatura de 170°C y con un tiempo de reacción de 1h logra solubilizar un 45.45 % de la lignina contenida en la biomasa de marabú, siendo un método de deslignificación adecuado para esta materia prima, además logra una solubilización de las hemicelulosas en un 40.45 %, obteniéndose pulpas ricas en celulosa.

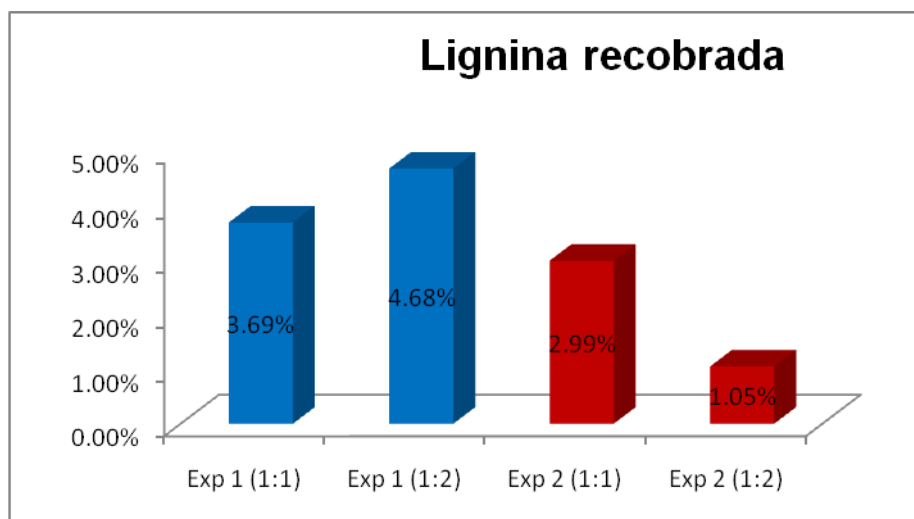
Figura 3.5. Solubilización de lignina y hemicelulosas en el pretratamiento con glicerol



3.2.1. Precipitación química de la lignina y las hemicelulosas en los licores obtenidos por cambio de disolvente

La precipitación de la lignina por cambio de disolvente (agua) y las hemicelulosas (etanol absoluto), del licor obtenido en el pretratamiento con glicerol al 60%, en una relación licor-disolvente de 1:1 y 1:2 en cada caso, arrojó como resultado que en una relación 1:2, empleando agua como disolvente, se obtiene un mayor contenido de lignina con solo 4.68 % de lignina recobrada (figura 3.6.). El porcentaje de lignina recobrada por este método es considerablemente bajo, demostrando que es necesario emplear otro método más eficiente para precipitar la lignina solubilizada del licor del pretratamiento, en cuanto a las hemicelulosas, aunque se aprecia la obtención de un precipitado, al filtrar los licores no fue posible cuantificar los resultados por este método.

Figura 3.6. Comportamiento del contenido de lignina recobrado en la precipitación por cambio de disolvente (agua)



Como se muestra en la figura 3.6 en todos los experimentos se obtienen valores bajos de lignina recobrada, aunque comparativamente los resultados son mejores en el experimento 1, recobrándose un 4.68 % de lignina cuando la relación agua-licor fue 2:1.

3.3. Deslignificación alcalina adicional

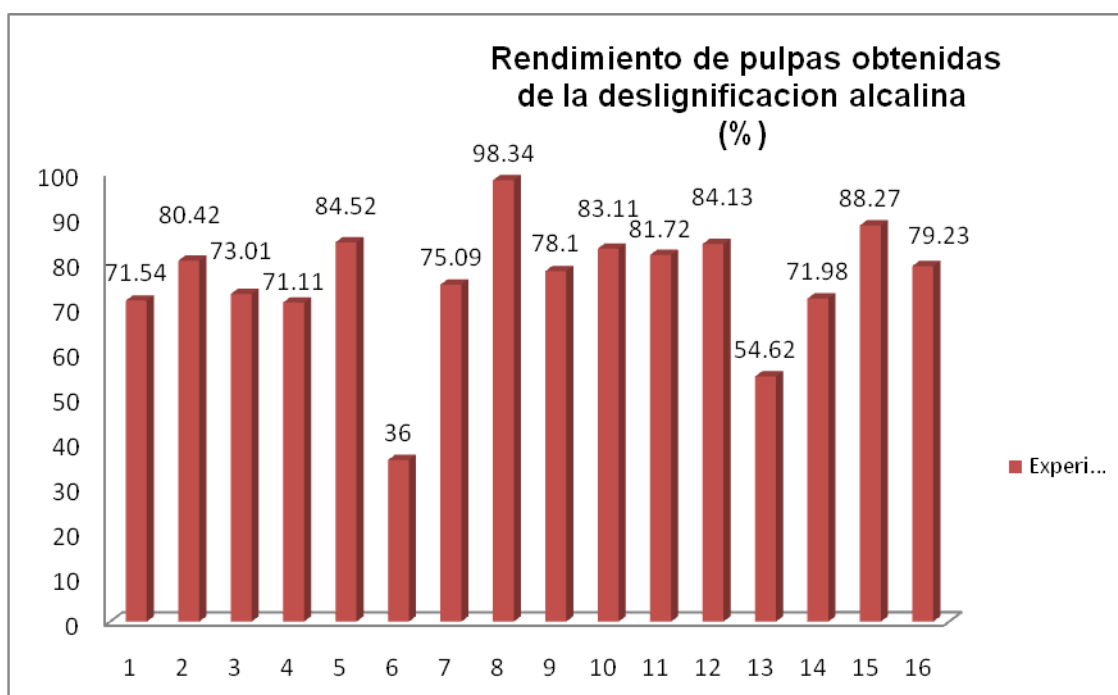
La deslignificación adicional con hidróxido de sodio al material obtenido del pretratamiento con glicerol al 60% fue realizada aplicando un diseño de experimentos de superficie de respuesta compuesto central, de tres factores y a tres niveles como se describe previamente en el epígrafe 2.4. La torta obtenida del pretratamiento con glicerol presenta un contenido de lignina de alrededor del 20 % por lo que según la bibliografía consultada es aplicable la hidrólisis alcalina para reducir el contenido de lignina en el material (Sun y Cheng, 2002).

El rendimiento de sólidos resultante de la deslignificación adicional con hidróxido de sodio se muestra en la figura 3.11.

Como puede apreciarse el mayor rendimiento es obtenido en el experimento 8 (98.34 %), el cual corresponde a un punto estrella sin adición de hidróxido de sodio, mientras que los rendimientos más bajos fueron obtenidos en los

experimentos 6 y 13 con 36 y 54.62 % respectivamente, ambos experimentos realizados con 1.25 % de hidróxido de sodio pero con un aumento de la severidad en ambos casos, el experimento 6 con un tiempo máximo (140 minutos), mientras que en el experimento 13 la temperatura fue máxima (130°C) por lo que la acción hidrolítica del hidróxido de sodio en estas condiciones es marcada, afectando incluso el contenido de celulosa (tabla 3.3), por lo que no son recomendables.

Figura 3.7. Rendimiento de pulpa en la deslignificación adicional



Los sólidos obtenidos como resultado de la deslignificación adicional (pulpas) fueron caracterizados químicamente para conocer el contenido de celulosa, hemicelulosas y lignina en los mismos y compararlos entre si y con la composición de la torta. Los resultados de la caracterización química se muestran en la tabla 3.3.

Como puede apreciarse el contenido de lignina es mínimo en el experimento 1, correspondiendo el mismo a un punto estrella respecto a la concentración de hidróxido de sodio, mientras que las condiciones de temperatura y tiempo son moderadas, por otro lado puede observarse que con una disminución de la concentración de hidróxido de sodio aumenta paulatinamente el contenido de lignina en las pulpas, cuando el por ciento de hidróxido de sodio es 2 % (experimentos 4,9, 14 y 16), el contenido de lignina hallado está entre 6.98 y 9.42, con 1.25 % de hidróxido de sodio (experimentos 2, 3, 6, 7, 13 y 15), el

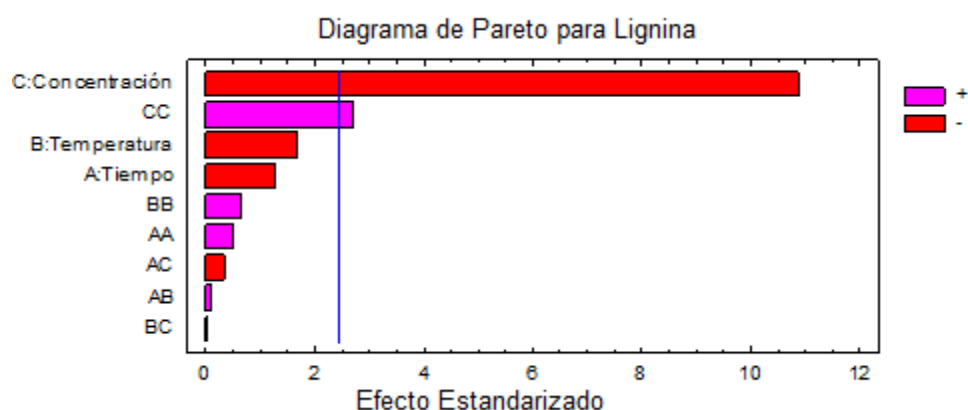
contenido de lignina remanente está entre 8.72 y 11.17 %, mientras cuando el por ciento de hidróxido de sodio fue de 0.5 % (experimentos 5, 10,11 y 12), el contenido de lignina está entre 18.31 y 26.55 %, lo que indica que con un aumento de la concentración de hidróxido de sodio en la mezcla deslignificante, aumenta la deslignificación de la torta.

Tabla 3.3. Resultados experimentales de la deslignificación adicional con hidróxido de sodio

N ^{ro}	Tiempo (min)	Temp. (°C)	Conc. (%)	Lignina (%)	Hemicelulosas (%)	Celulosa (%)
1	90	100	2.5	6.47	16.5	77.24
2	40	100	1.25	11.15	19.5	68.57
3	90	100	1.25	9.87	17.5	71.51
4	120	120	2	6.98	17	75.12
5	120	120	0.5	16.55	18.5	63.99
6	140	100	1.25	8.72	18.5	71.85
7	90	100	1.25	10.91	16	72.90
8	90	100	0	19.39	18.65	61.02
9	60	80	2	9.42	16.5	73.47
10	60	80	0.5	18.31	18.5	62.82
11	60	120	0.5	16.93	18.5	63.88
12	120	80	0.5	17.98	18	63.77
13	90	130	1.25	9.05	18	72.10
14	60	120	2	7.85	16	75.93
15	90	66	1.25	11.17	18	69.95
16	120	80	2	8.17	18	72.99

El análisis de significación reveló que el efecto lineal y cuadrado de la concentración de hidróxido de sodio influyen de manera significativa sobre el contenido de lignina en las pulpas, como lo muestra el diagrama de Pareto (figura 3.8), siendo este el único factor que influye significativamente en la deslignificación de este material. El análisis de varianza muestra que los valores del *p-value* son menores que 0.05, para un 95 % de confianza.

Figura 3.8. Diagrama de Pareto para la variable contenido de lignina



La segunda etapa de deslignificación alcalina disminuyó en gran medida el contenido de lignina en la biomasa de marabú.

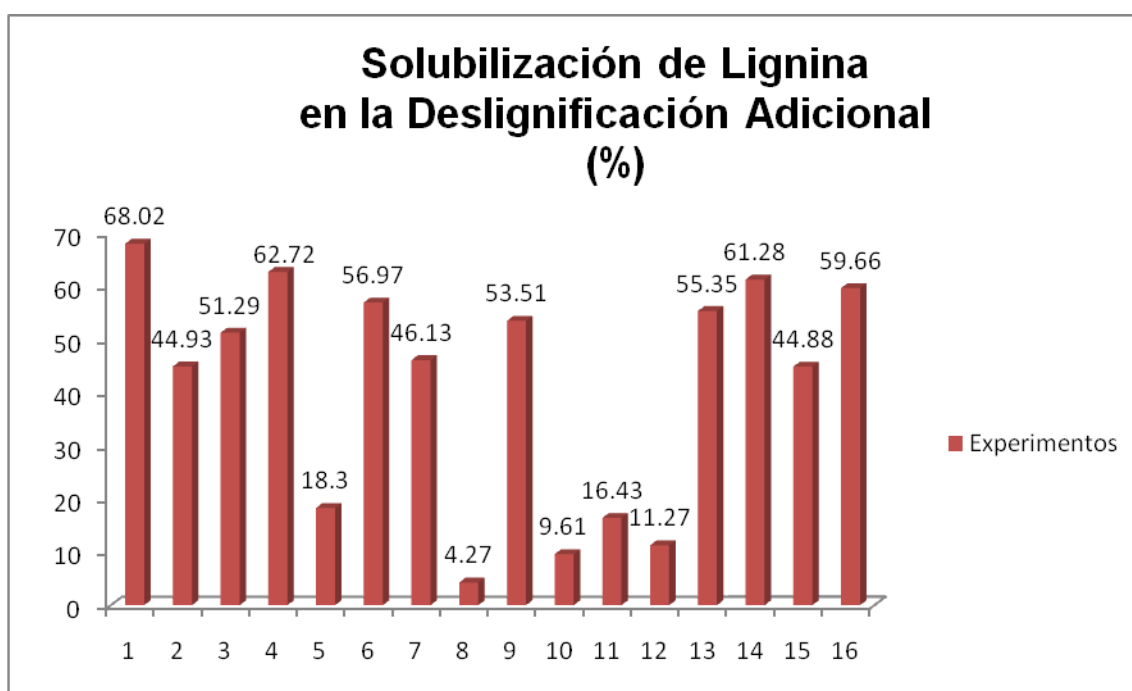
A partir de los resultados experimentales se obtuvo un modelo matemático que refleja la correlación de la lignina con el factor concentración de hidróxido de sodio (Ecuación 3.1). El modelo permitió predecir con una elevada precisión un valor mínimo de lignina de 5.69508 % en las condiciones óptimas de trabajo.

$$Lignina = 35.6114 - 10.903 * Conc. + 2.31937 * Conc.^2 \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

La figura 3.9. revela la eficiencia de la etapa de la deslignificación con hidróxido de sodio, donde las condiciones (tabla 3.3.) de concentración de hidróxido de sodio, temperatura y tiempo óptimos se manifiestan en el experimento 1, para obtener una alta solubilización de la lignina (68.02%) en material previamente tratado con glicerol al 60% (figura 3.9), además el contenido de lignina mínimo remanente en las pulpas puede apreciarse en el diagrama de superficie de respuesta estimada para el contenido de lignina (Anexo 2).

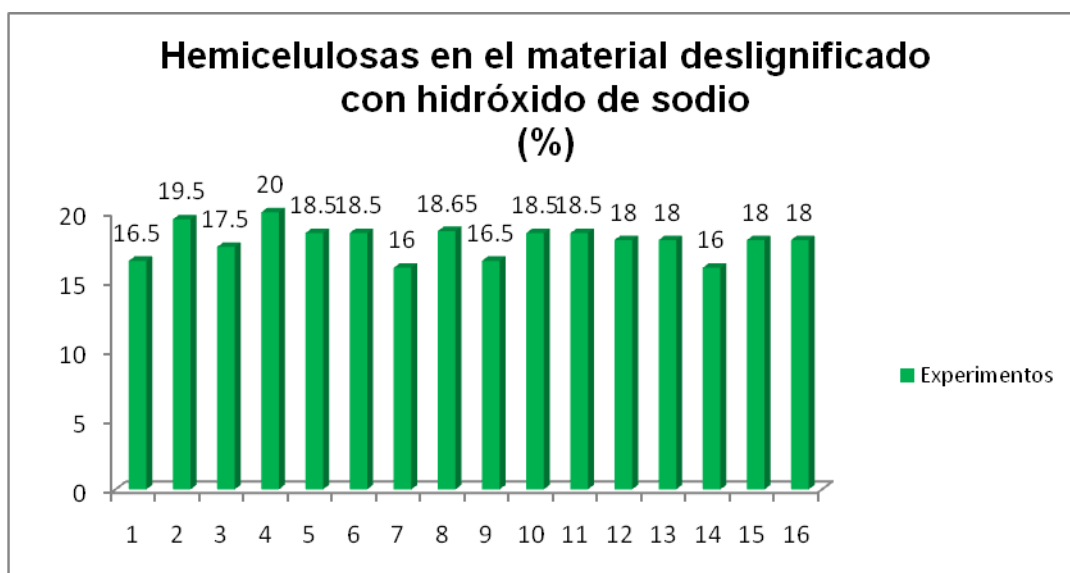
El resultado obtenido es comparable con otros pretratamientos de deslignificación combinados aplicados a la biomasa de marabú en trabajos precedentes, donde se obtuvo una solubilización de la lignina entre 46.6 y 84.8%, según las condiciones aplicadas (Rodríguez, 2011; Venkata *et al.*, 2011).

Figura 3.9. Solubilización de la lignina



El contenido remanente de hemicelulosas (expresado como polisacáridos fácilmente hidrolizables) en el material deslignificado con hidróxido de sodio se observa en las figuras 3.10.

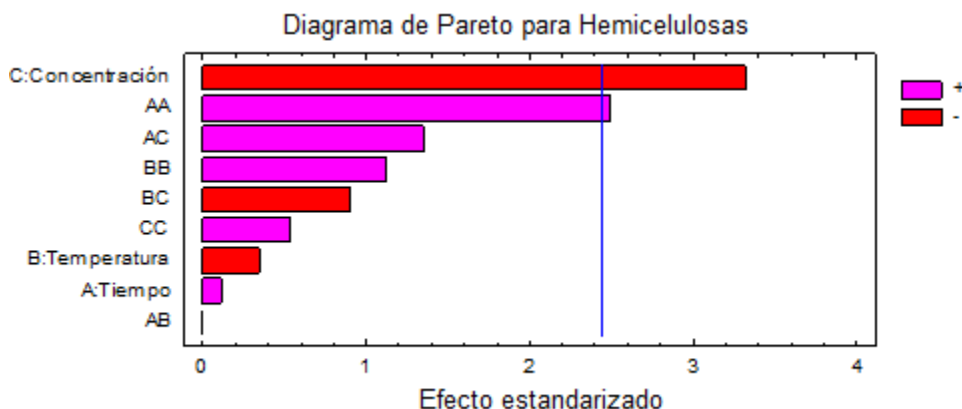
Figura 3.10. Contenido de Hemicelulosas



El análisis de significación, como se observa en el diagrama de Pareto (Figura 3.11) reveló que la concentración de hidróxido de sodio y la interacción al cuadrado del tiempo son los factores que ejercen influencia significativa sobre la solubilización de las hemicelulosas. Se obtuvo un modelo (Ecuación 3.3) que permitió predecir el contenido máximo de hemicelulosas en dependencia de las

condiciones operacionales. El análisis de varianza muestra que los valores del *p-value* son menores que 0.05, para un 95 % de confianza.

Figura 3.11. Diagrama de Pareto para la variable contenido de hemicelulosas



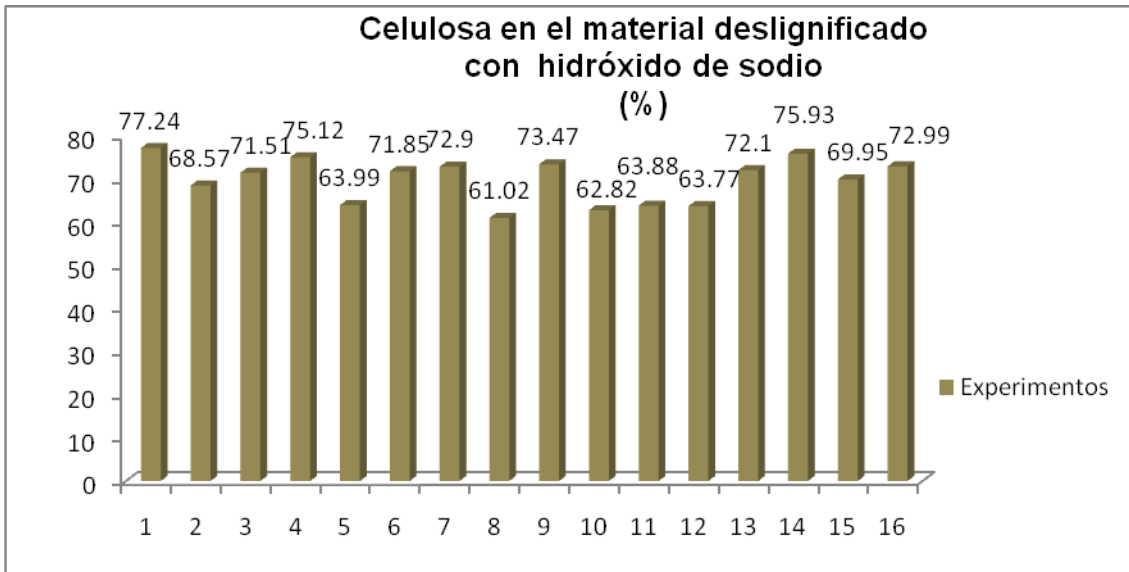
$$\text{Hemicelulosas} = 31.4888 - 1.39129 * \text{Conc.} + 0.0000714579 * \text{Tiempo}^2 \text{ (Ecuación 3.3)}$$

El contenido de hemicelulosas máximo remanente en las pulpas en las condiciones óptimas de experimentación pudo obtenerse en el diagrama de superficie de respuesta estimada para el contenido de lignina (Anexo 4).

La influencia de la deslignificación adicional con hidróxido de sodio sobre el contenido de celulosa es notable, marcada por la eficiente remoción del contenido de lignina y hemicelulosas de la biomasa de marabú.

El contenido remanente de celulosa (expresado como polisacáridos difícilmente hidrolizables) en el material deslignificado con hidróxido de sodio se observa en la figura 3.12. El enriquecimiento de celulosa en el material pretado se justifica por la eficiencia de la etapa de deslignificación adicional, obteniéndose pulpas con un alto contenido de celulosa comparable con otros métodos de deslignificación aplicados al mismo material (Rodríguez, 2011; Venkata *et al.*, 2011).

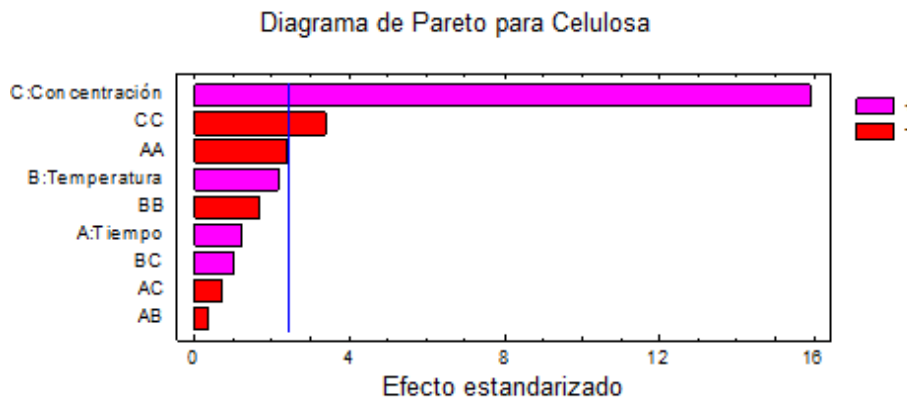
Figura 3.12. Contenido de celulosa en el material deslignificado



Como puede apreciarse en el experimento 1 se obtiene una pulpa con un contenido máximo de celulosa (77.24 %), coincidiendo con el contenido mínimo de lignina (Tabla 3.3).

El análisis de significación (figura 3.13) mostró que el efecto lineal y cuadrado de la concentración de hidróxido de sodio influyen de manera significativa sobre el contenido de celulosa, expresado como polisacáridos difícilmente hidrolizables, en el material. El análisis de varianza muestra que los valores del *p-value* son menores que 0.05, para un 95 % de confianza.

Figura 3.13. Diagrama de Pareto para la variable contenido de Celulosa



Los resultados experimentales ofrecieron un modelo matemático que muestra la correlación entre el contenido de Celulosa y el factor concentración se

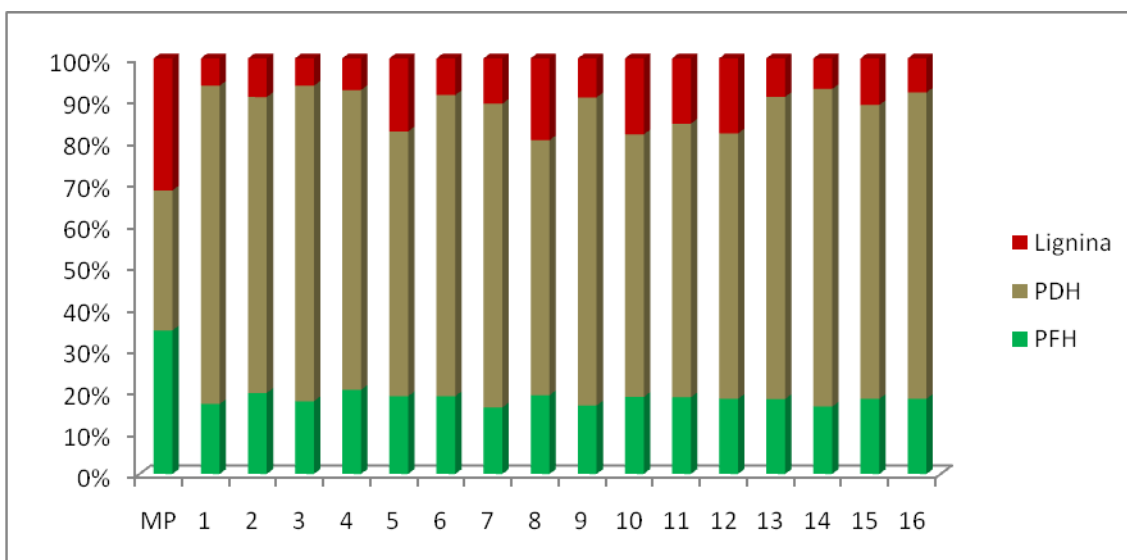
expresa en el modelo obtenido (Ecuación 3.2). El modelo permitió predecir con precisión, un valor máximo de celulosa de 78.07%. El análisis de varianza muestra que los valores del *p-value* son menores que 0.05, para un 95 % de confianza.

$$Celulosa = 30.5132 + 11.1491 * Conc. + 2.34648 * Conc.^2 \quad \text{(Ecuación 3.2)}$$

El contenido de celulosa máximo remanente en las pulpas en las condiciones óptimas de experimentación pudo obtenerse en el diagrama de superficie de respuesta estimada para el contenido de celulosa (Anexo 3).

Haciendo una comparación de la composición de las pulpas obtenidas con la materia prima (Figura 3.14) puede apreciarse la marcada diferencia en cuanto a sus principales componentes (celulosa, hemicelulosas y lignina) observándose una disminución considerable del contenido de lignina y hemicelulosas, así como el incremento paulatino del contenido de celulosa con el aumento de la concentración de hidróxido de sodio.

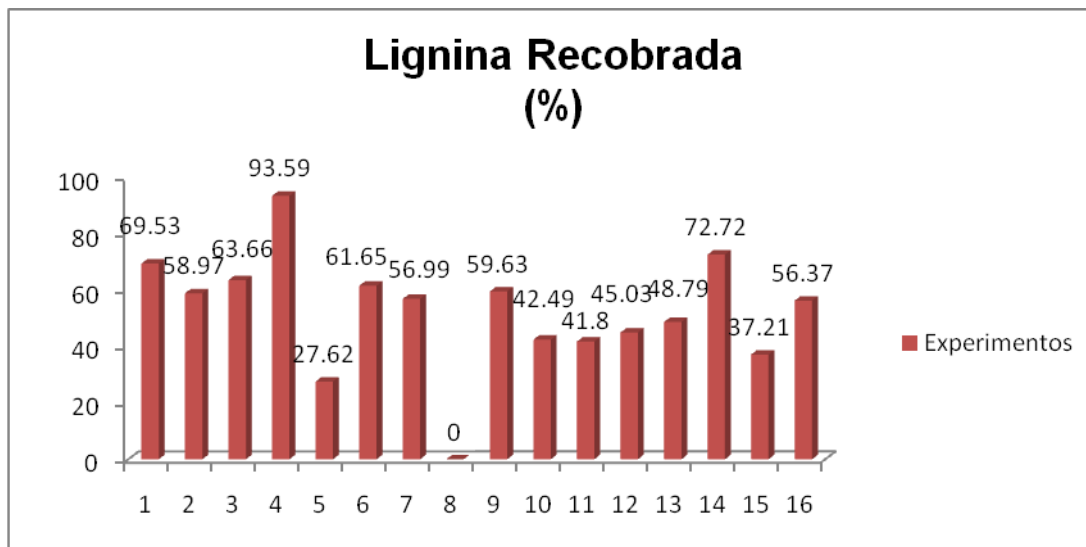
Figura 3.14. Composición de la materia prima y pulpas obtenidas



Como resultado del proceso de deslignificación adicional se obtiene un licor negro rico en lignina con un elevado pH por la alta concentración de hidróxido de sodio en los mismos. La lignina contenida en los licores fue precipitada según el procedimiento abordado anteriormente (epígrafe 2.1.4). La lignina recobrada a partir de la precipitación química por cambio de pH se observa en

la figura 3.15, mostrando como valor máximo en el experimento 4 donde se obtuvo un 93.59 % de lignina recobrada y el experimento 8 con un valor nulo, justificado por el no empleo de hidróxido de sodio en la deslignificación alcalina.

Figura 3.15. Lignina recobrada en la precipitación

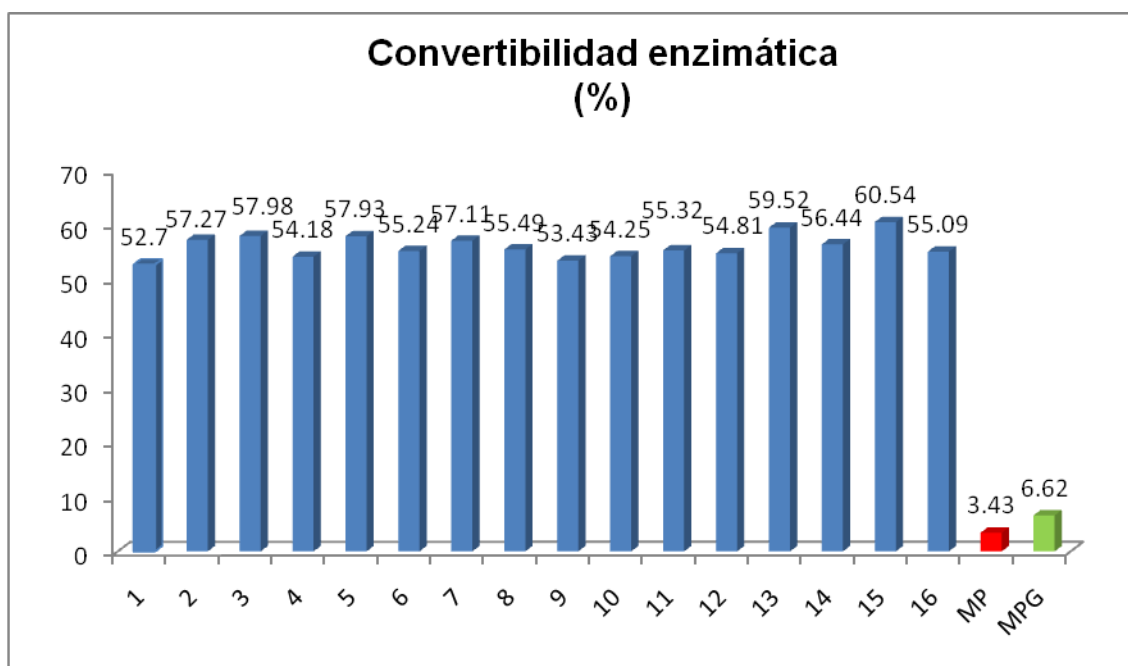


La lignina obtenida como resultado de la precipitación por cambio de pH presenta un color muy claro, por lo que se puede pensar que no está muy degradada, constituyendo este un método para obtener lignina cercana a su composición natural, en cualquier caso es necesario caracterizar la misma, aspecto que sale de los marcos del presente trabajo.

3.4. Hidrólisis enzimática.

La determinación de la convertibilidad enzimática se realizó según el procedimiento descrito en el epígrafe 2.4.2, arrojando como resultado una convertibilidad enzimática relativamente alta al compararla con resultados obtenidos con las pulpas acetosolv y con glicerol (Rodríguez, 2011, inédito), el comportamiento descrito puede observarse en la figura 3.16, donde se reportan en todos los casos valores por encima de un 50% de convertibilidad de la celulosa contenida en las pulpas a glucosa, constituyendo un resultado importante en el proceso de producción de etanol celulósico.

Figura 3.16. Convertibilidad enzimática de la biomasa de marabú pretratado y deslignificado.



Al comparar la convertibilidad enzimática de las pulpas con la convertibilidad enzimática de la materia prima y la torta en las mismas condiciones podemos inferir que el pretratamiento con hidróxido de sodio ejerce una influencia acentuada en el proceso de hidrólisis enzimática de las pulpas, lo cual puede estar asociado a que el hidróxido de sodio actúa sobre los enlaces éster intermoleculares que unen a los xilanos de las hemicelulosas con los demás componentes (lignina y celulosa), aumentando así la porosidad del material pretratado, haciendo la celulosa más accesible a las enzimas (Sun y Cheng, 2002).

Conclusiones

- El proceso de deslignificación adicional con disoluciones de hidróxido de sodio permitió la solubilización de la lignina entre un 50 y un 60% en los casos de mayor concentración del disolvente alcalino, reduciendo el contenido de lignina en las pulpas y de esta forma confirmando la validez de la hipótesis planteada.
 - El alto contenido de carbohidratos (62.72%) expresado como celulosa (30.97%) y hemicelulosas (31.75%), califica a la biomasa de marabú como materia prima potencial para la producción de etanol celulósico, además su alto contenido de lignina (29,20 %), justifica su utilización como combustible sólido con un alto valor calórico, por lo que parte de la lignina obtenida pudiera suplir las necesidades energéticas en los procesos de producción de etanol celulósico y el resto ser utilizado en la obtención de derivados fenólicos y otros productos de alto valor agregado.
- El diseño de experimentos aplicado a la deslignificación alcalina adicional con hidróxido de sodio reveló como factor que influye significativamente en la solubilización de la lignina a la concentración, resultando los valores de 2.51 % de hidróxido de sodio a la temperatura de 119.31^oC y un tiempo de 136.58 minutos los óptimos para obtener un mínimo de lignina en la pulpa (5.7%).
- La hidrólisis enzimática de las pulpas de marabú deslignificadas con hidróxido de sodio reveló valores de convertibilidad enzimática superiores al 50%, calificando de aceptable su convertibilidad enzimática.

Recomendaciones

1. Escalar paulatinamente el proceso de deslignificación alcalina adicional, basado en los resultados obtenidos en los experimentos.
2. Aplicar un método más eficiente para la precipitación de la lignina por cambio de disolvente al licor obtenido del pretratamiento con glicerol al 60%.
3. Para incrementar la convertibilidad enzimática de las pulpas obtenidas por tratamiento con glicerol y deslignificación adicional con hidróxido de sodio se recomienda detoxificar el material pretratado.

Bibliografía

1. Abril, A. (2008) Etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Memoria del I Taller Nacional de Etanol celulósico. pp. 231- 311 ISBN 97 8-959-7 165-22-4.
2. Agarwal, A.K. (2007) Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science* 33, 233–271.
3. Araque, E., Parra, C., Rodríguez, M., Freer, J., Baeza, J. (2008) Selection of thermotolerant yeast strains *S. cerevisiae* for bioethanol production. *Enzyme Microb. Tech.*, 43, 120-123.
4. Bailey, B.K. (1996) Performance of ethanol as a transportation fuel. En *Handbook on bioethanol: Production and utilization*. Ed. Wyman, C.H., Taylor & Francis Inc, Bristol, PA pp 37-60.
5. Bak, J., Ko, J., Han, H., Lee, C., Choi, I., Kim, H. (2009) Improved enzymatic hydrolysis yield of rice straw using electron beam irradiation pretreatment. *Bioresource Technology* **100**, 1285 – 1290.
6. Balat, M., Balat, H., Öz, C. (2008) Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, 551-573.
7. Banerjee, R., Pandey, A.. (2002) Bio-industrial applications of sugarcane bagasse: A technological perspective. *Int. Sugar J.*, **104**, 64-68.
8. Bazarnova, N.G. (2002) *Khimija Drevesiny y ee osnovnykh komponentov*. Utchebnoe posobie. Altaiyskii Gosudarstvennyi Universitet. Barnaul, Russia.
9. Berg, C. (1998) Towards a world ethanol market? *F.O.Licht Commodity Analysis*, Germany.
10. Bjerre, A.B., Olesen, A.B., Fernqvist, T., Plöger, A., Schmidt, A.S. (1996) Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline

hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. *Biores. Technol.*, 49, 568-577.

11. Börjesson, J., Peterson, R., Tjerneld, F. (2007) Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocellulose by poly (ethylene glycol) addition. *Enzyme Microb. Tech.* 40, 754-762.
12. Bozell, J.J., Holladay, J.E., Johnson, D., White, J.F. (2007) Top value added chemicals from biomass. Volume II: Results of screening for potential candidates from biorrefinery lignin. U.S. *Department of energy, Report PNNL-16983*, Washinton DC.
13. Brizuela, M.A., González, P., La Serna, G., Santiesteben, C. (2000) Enzima celulasa. En *Manual de los derivados de la caña de azúcar* (Ed. L.O. Gálvez). Tercera Edición. La Habana, Cuba.
14. Bueno, G. (2008). Situación mundial sobre tecnologías de etanol celulósicos. Memoria del I Taller Nacional de Etanol celulósico. pp. 29-44 ISBN 97 8-959-7 165-22-4.
15. Caldwell, W. (2006) "Subcritical Water and Chemical Pretreatments of cotton stalk for the Production of Ethanol". Faculty of North Carolina State University. p.103.
16. Chang, V., Holtzaple, M., 2000. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84–86, 5–37
17. Chum, L.H, Douglas, J.L., Fernberg, A. D. (1985). "Evaluation of Pretreatments of Biomass for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose". Solar Energy Research Institute. Colorado State University. No. DE-ACO2-83CH10093. p. 77.
18. Claassen, P.A., Sijtsma, L., Stams, A.J.M., De Vries, S.S., Weusthuis, R.A. (1999) Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, 741-745.
19. Chundawat, S. P., Venkatesh, B., Dale, B. E. (2007) Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility. *Biotechnol. Bioeng.*, 96,219-231.

20. Cordovés, M. (2001) Consideraciones ambientales sobre el uso del etanol carburante. *Memorias del III Taller Internacional de Producción de Alcohol*. Varadero, Cuba. ISBN 959-160095X.
21. Costales, R., Namer, I. (2000) Residuos de cosecha procesados. En *Manual de los derivados de la caña de azúcar* (Ed. L.O. Gálvez). Tercera Edición. La Habana, Cuba.
22. Cumbre de la Tierra (junio, 1992). Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo., Río de Janeiro, Brasil.
23. Cuzens, J. C., Miller, J. R. (1996). Acid hydrolysis of bagasse for ethanol production. *Renewable Energy*, 10, 285-290.
24. De Armas, C. (2000) Energía en la producción de azúcar de caña, sus requerimientos y reservas. En *Manual de los derivados de la caña de azúcar* (Ed. L.O. Gálvez). Tercera Edición. La Habana, Cuba.
25. Di Pardo, J. (2000) Outlook for biomass ethanol production and demand. [Disponible en: <http://www.eia.doe.gov/oiaf/analysispaper/biomass.html>].
26. Dale, B.E., Moreira, M.J.A. (1982) A freeze-explosion technique for increasing cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 12, 31-43.
27. Demirbas, A. (2007) Progress and recent trends in biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, 33, 1-18
28. Demirbas, A. (2008) Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy conversion and Management*, 49, 2106-2116.
29. Eggeman, T., Elander, R. T. (2005) Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresource Technol.*, 96, 2019-2025.
30. Fan, L., Gharpuray, M., Lee, Y.-H. (1987). en: *Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs*. Springer, Berlin, p. 57.
31. Fengel, D., Wegener, G. (1989) *Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter, Berlin, 274-276.
32. Galbe, M. (1994) Ethanol from wood: An experimental study of pretreatment and hydrolysis process simulation. PhD Thesis. Department of Chemical Engineering I, Lund University, Sweden.

33. Gastón, C., Bambanaste, R., Correa, J., Alfonso, G., Herryman, M. (2000) Bagazo. En Manual de los derivados de la caña de azúcar (Ed. L.O. Gálvez). Tercera Edición. La Habana, Cuba. pp.31-44.
34. Gregg, D., Saddler, J. N. (1996) A techno-economic assessment of the pretreatment and fractionation steps of a biomass-to-ethanol process. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **57/58**, 711-727.
35. Grohmann, K., Baldwin, E.A., Buslig, B.S. (1994) Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed orange peel by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 45/46. 315-327.
36. Grohmann, K., Manthey, J.A., Cameron, R.G., Buslig, B.S. (1998) Fermentation of galacturonic acid and pectin rich materials to ethanol by genetically modified strains of *Erwinia*. *Bioresourse Letters*. 20. 195-200.
37. Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G, Zacchi G (2006) Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol* 24, 549-556.
38. Hendricks, A.T.W.M., Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. 100, 10–18.
39. Hernández, M.T., Sais, T., Sánchez, O. (1986) Microbiología de la Producción Azucarera. Producciones Microbianas Derivadas. Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Cuba.
40. ICIDCA. (1987) La industria de los derivados de la caña de azúcar. Editorial Científico-Técnica. La Habana.
41. Ingledew, W.M. (1995) The Biochemistry of alcohol production. En *The Alcohol Textbook* (Eds. Lyons, T., Kelsall, D., Murtagh, J.). Nottingham University Press, pp. 76-87.
42. Itoh, H., Wada, M., Honda, Y., Kuwahara, M., Watanabe, T. (2003) Bioorganosolv pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. *J. Biotechnol.*, 103, 273-280.

43. Jiang, Z., Yang, Z., So, C., Hse, C. (2007) Rapid prediction of wood crystallinity in *Pinus elliotii* plantation wood by near-infrared spectroscopy. *The Japan wood research society* **53**, 449 – 453.
44. Klinke, H.B., Ahring, B.K., Schmidt, A.S., Thomsen, A.B. (2002) Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource Technol.*, **82**, 15-26
45. Khol'kin, Y. I., Makarov, V.L., Vyglazov, V.V., Elkin, V.A., Mettee, H.D. (1999) Technological and ecological aspects of ethanol production from wood. *Proc. Biomass Conf. Am.*, 4th. (Overend, R.P., Chornet, E., eds.) **1**, 881-885.
46. Laser, M., Schulman, D., Allen, S. G., Lichwa, J., Antal, M. J., Lynd, L. R. (2002) A comparison of liquid hot water and steam pretreatment of sugarcane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technol.*, **81**, 33-44.
47. Ligeró, P., Villaverde, J.J., Vega, A., Bao, M. (2008). Delignification of *Eucalyptus globulus* saplings in two organosolv systems (formic and acetic acid) Preliminary analysis of dissolved lignins, crops and products. **27**, 110–117.
48. Licht, F.O. (2006) World's ethanol markets: The Outlook to 2015, Tunbridge Wells, Agra Europe special report, UK.
49. Macedo, I.D. (1998) Greenhouse gas emissions and energy balances in bio-ethanol production and utilization in Brazil. *Biomass and Bioenergy*, **14**, 1, 77-81.
50. Macedo, I.C., Leal, M.R.L.V., da Silva, J. (2004) Balanço das emissões de gases do efeito estufa na produção e no uso do etanol no Brasil. Reporte. Secretaria do Meio Ambiente, Governo de São Paulo.
51. McMillan, J. (1994). Pretreatment of lignocellulosic biomass. en: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 292–324.
52. Martín, C., Obolenskaja, A.V. (1988) Khimitcheskij analiz bagassy sakharnogo trostnika y polutchenje dioksan-lignina. Report. Kafedra Khimii Drevesiny. Leso-tekhnicheskaja Akademija. Leningrad, SSSR.

53. Martin, C. (2002). Tesis Doctoral, Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química Mecánica, Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba.
54. Martín, C. (2002). "Estudio de la inhibición de la fermentación de hidrolizados de bagazo de caña de azúcar para la producción de etanol". p. 149.
55. Méndez, S., Ramos, J. (2004) El marabú: ¿plaga o recurso natural? *Energía y tú* 27,11-17.
56. McKendry, P., 2002. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technology*. 83, 37–46.
57. Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 31, 420-428.
58. Mosier, N., Hendrickson, R., Brewer, M., Ho, N., Sedlak, M., Dreshel, R., Welch, G., Dien, B.S., Aden, A.M., Ladisch, M.R. (2005) Industrial scale-up of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn fiber for fuel ethanol production. *Appl. Biochem. Biotech.*, 125, 77-97
59. Moiser, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. Ladisch, M., (2005b). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96, 673–686.
60. Moyroud, R. (2000) Exotic weeds that threaten the Caribbean: a brief overview and early alarm call. *Wildland Weeds*. Spring issue, pp. 4-8.
61. Muurinen, M. (2000). "Organosolv Pulping. A review and distillation study related to peroxyacid pulping". Oulu University Library. ISBN 951-42-5661-1. p.314.
62. Nguyen, Q. A. (1993) Economic analyses of integrating a biomass-to-ethanol plant into a pulp/saw mill. In: *Bioconversion of forest and agricultural residues*. (J. N. Saddler, ed.), CAB International, Wallingford, pp. 321-340.
63. Noa, H., Zegarra, J., Zavala, A., Monegro, J.T. (1991) La diversificación de la agroindustria de la caña de azúcar. Serie Diversificación. GEPLACEA. México.
64. Nunes de Vasconcelos, J. (2008) Desafío de la industria alcoholera de Brasil. En *Açucar, alcohol e subproductos*, p. 18-19. Tomado de *NotiEtanol.Comunicación sobre la Industria del Etanol*, 4, 2.

65. Obolenskaja, A.V. (1986) *Laboratornye raboty po Khimii Drevesiny*. Leningradskaja Lesotekhnicheskaja Akademija. Leningrad. 72 pp.
66. Olsson, L. (1994) Ethanol production from lignocellulosic materials: Fermentation and on-line analysis. PhD. Thesis. Department of Applied Microbiology, Lund University, Sweden.
67. Pan, X., Gilkes, N., Kadla, J., Pye, K., Saka, S., Gregg, D., Ehara, K., Xie, D., Lam, D., Saddler, J. (2006). Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolv fractionation process: Optimization of process yields. *Biotechnol. Bioeng.*, 94(5), 851-861.
68. Prasad S, Singh A, Joshi HC (2007) Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling* 50, 1–39
69. Pimentel, D. (2001) Ethanol fuels: Energy, economics and environmental impact. *Int. Sugar J.*, 103, 491-494.
70. Puls, J. (1993) Substrate analysis of forest and agricultural wastes, in *Bioconversion of forest and agricultural residues*, ed. By Saddler, J.N., CAB International, Wallingford, pp. 13-32.
71. Puri, V.P., Pearce, G.R. (1985) Alkali-explosion pretreatment of straw and bagasse for enzymic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 480-485.
72. Rass-Hansen, J., Falsig, H., Jørgensen, B., Christensen, C.H. (2007) Perspective Bioethanol: fuel or feedstock? *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 82, 329-333.
73. Rodríguez, D. (2011) Fraccionamiento de la biomasa de marabú (*Dichrostachys cinerea*) mediante el proceso acetosolv para la producción de etanol. Tesis de Maestría. UMCC. Matanzas.
74. Rowell. M.R. (2005). "Handbook of Wood Chemistry and Wood composites". Editorial CRC Press. New York Washington, D.C. ISBN 0-8493-1588-3. Capítulo 2 Pág. 27 y Capítulo 14, Pág. 47.
75. Saddler, J.N., Ramos, L., Breul, C. (1993) Steam pretreatment of lignocellulosic residues. In: *Bioconversion of forest and agricultural residues*. (J. N. Saddler, ed.), CAB International, Wallingford, pp. 73-91. 177.

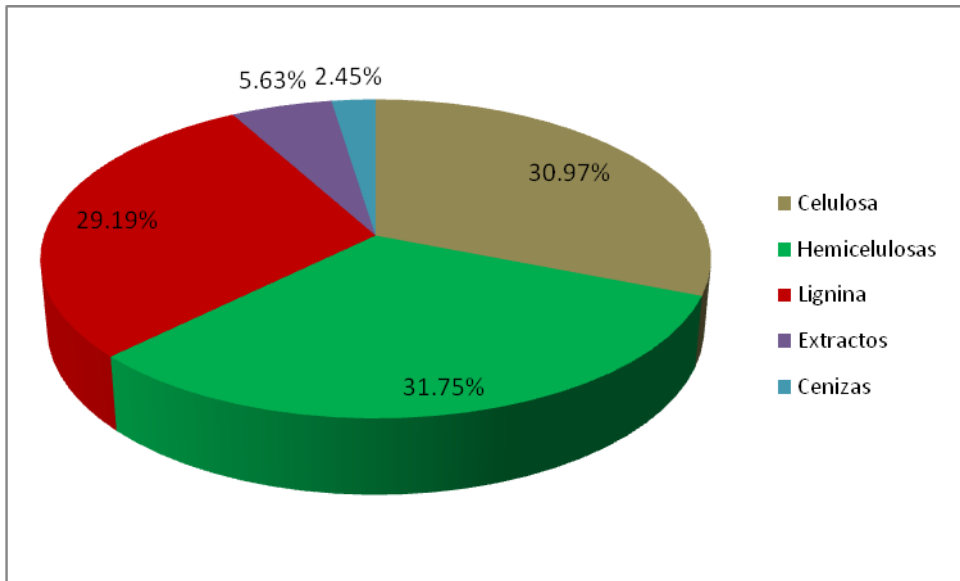
76. Sánchez, O.J., Cardona, C.A. (2007) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feed stocks. *Bioresource Technology* **99**, 5270–5295.
77. Sannigrahi, P., Pu, Y., Ragauskas, A. (2010) Cellulosic biorefineries—unleashing lignin opportunities. *Current Opinion in Environmental Sustainability* **2**, 383–393
78. Schmidt, A.S., Thomsen, A.B. (1998) Optimization of wet oxidation pretreatment of wheat straw. *Bioresource Technol.*, **64**, 139-151.
79. Schurz, J. (1997) How to make native lignocellulosic materials accessible to chemical and microbial attack. *Proc. Bioconversion. Symp. IIT Delphi*, 37-58.
80. Schulman, D.E., Allen, S., Lichwa, J., Antal, M.J., Laser, M., Lynd, L. (1999) Comparison of steam and hot liquid water pretreatments for the bioconversion of lignocellulosics to ethanol. *Prepr. Symp. Am. Chem. Soc., Div. Fuel Chem.*, **44**, 219-223.
81. Sluiter, A., Hames, B., Payne, C., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. (2008a) Determination of insoluble solids in pretreated biomass material. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42627. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado.
82. Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. (2008b) Determination of ash in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42622. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado.
83. Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. (2008 c) Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado.
84. Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. (2008 d) Determination of extractives in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42619. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado

85. Soudham, V.P., Rodríguez, D., Rocha, G.J.M., Taherzadeh, M.J., Martín, C. (2011) Acetosolv delignification of marabou (*Dichrostachys cinerea*) wood with and without acid prehydrolysis. *Forestry Studies in China* **13**, 63-70.
86. Sun, Y., Cheng, J. (2002) Hydrolysis of the lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technol.*, 83(1), 1-11.
87. Sun, F., Chen, H. (2008). "Organosolv pretreatment by crude glycerol from oleochemicals industry for enzymatic hydrolysis of wheat straw". *Bioresource Technology* 99. 5474-5479. Elsevier Science Limited. Pág 6.
88. Taherzadeh, M.J., Karimi, K. (2007a) Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources*, **2**, 472-499.
89. Taherzadeh, M., Karimi, K. (2007b) Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *Bioresource* 2(4), 707-738.
90. Tengborg, C. (2000). Ethanol from biomass: optimisation of pretreatment and hydrolysis. PhD Thesis. Department of Chemical Engineering I, Lund University, Sweden.
91. Tengborg, C., Galbe, M. Zacchi, G. (2001) Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. *Biotechnol. Prog.* 17(1). 110-117.
92. Venkata, P., Rodríguez, D., Rocha, G., Taherzadeh, M., Martín, C (2011) Acetosolv delignification of marabou (*Dichrostachys cinerea*) wood with and without acid prehydrolysis. *Forestry Studies in China*, 13(1): 63–70.
93. Wakeling, L., Bond, W.J. (2007) Disturbance and the frequency of root suckering in an invasive savanna shrub, *Dichrostachys cinerea*. *African J. Range Forage Sc* 24: 73–76.
94. Wheeler, K., Janshekar, H., Sakuma (1991) Ethyl alcohol, en *Chemical Economics Handbook*. SRI International, USA.
95. Wyman, C.E. (1999) Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, and opportunities. *Bioresource. Technol.* 50 3-16.
96. Wyman, C.E. (2003) Potencial synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals and power. *Bioethanol. Prog.* **19**, 254-262.

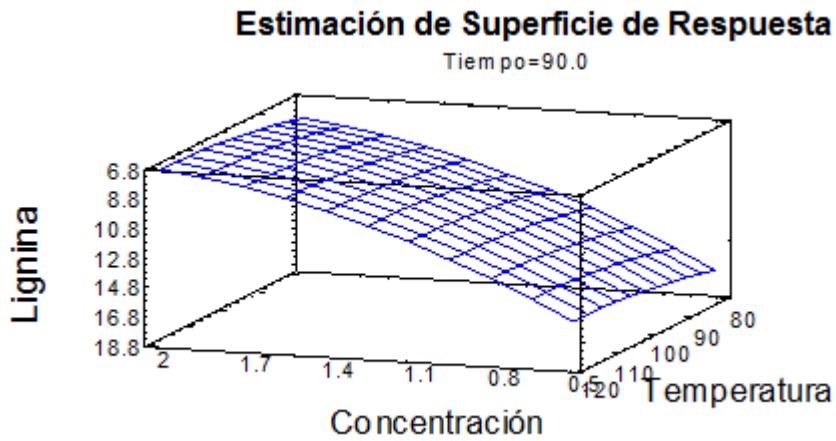
- 97.** Xu, Feng., Sun, Jin-Xin., Sun, RunCang., Fowler, Paul., Baird, Mark S. (2006). Comparative study of organosolv lignins from wheat straw. *Industrial Crops and Products*. 23, 180–193.
- 98.** Yúfera, P. E. (2002). “Química Orgánica básica y aplicada”. Editorial Reverte. S.A. Universidad
- 99.** Zheng, Y., Ling, H., Tsao, G.T. (1998) Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. *Biotechnol. Prog.*, 14, 890-896. Politécnica de Valencia, España. Tomo I. Pág. 801.
- 100.** Zheng, Y., Mosier, N.S., Huang, C.P., Sherman, D.M., Ladisch, M.R. (2007) Microscope examination of changes of plant cell structure in corn stover do to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 97(2), 265-278.
- 101.** Zohreh, A. (2008). Ethanol and glucose tolerance of *M.indicus* in aerobic and anaerobic conditions.

Anexos

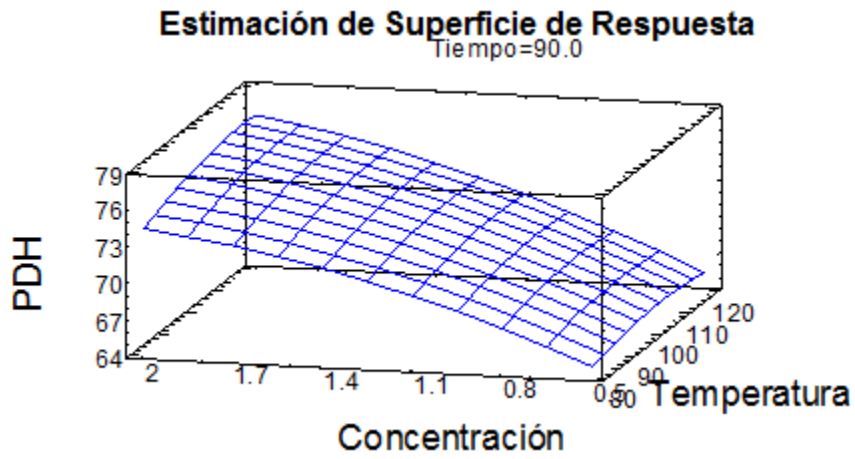
Anexo 1. Caracterización de la Biomasa de marabú.



Anexo 2. Superficie de respuesta estimada para el contenido de lignina.



Anexo 3. Superficie de respuesta estimada para el contenido de celulosa.



Anexo 4. Superficie de respuesta estimada para el contenido de hemicelulosa.

