



**EDUCACIÓN**

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

**“ESTUDIO DEL PROCESO DE DESLIGNIFICACIÓN DE  
MADERA PARA LA MAXIMIZACIÓN DE  
LA REDUCCIÓN DE LIGNINA”.**

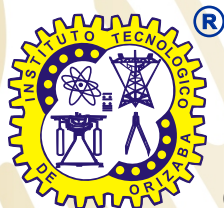
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

*I.Q. Héctor Daniel Hernández Ramos*

DIRECTOR DE TESIS:

*Dra. Leticia López Zamora*



ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO.

MARZO 2021



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba  
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Orizaba, Veracruz, 05/03/2021  
Dependencia: División de Estudios de  
Posgrado e Investigación  
Asunto: Autorización de Impresión  
OPCION: I

C. HÉCTOR DANIEL HERNÁNDEZ RAMOS  
Candidato a Grado de Maestro en:  
CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA  
P R E S E N T E.-

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

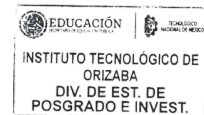
" Estudio del proceso de deslignificación de madera para la maximización de la reducción de lignina".

Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®  
CIENCIA – TÉCNICA - CULTURA®

Dr. MARIO LEONCIO ARRIOLA RODRÍGUEZ  
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



Avenida Oriente 9 No. 852  
Col. Emiliano Zapata, C.P. 94320  
Orizaba, Veracruz, México.  
Teléfono: 272-110-53-60  
Email: [depi\\_orizaba@tecnm.mx](mailto:depi_orizaba@tecnm.mx)  
[www.orizaba.tecnm.mx](http://www.orizaba.tecnm.mx)





**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba  
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Orizaba, Veracruz, **Febrero 22 de 2021**

Asunto: **Revisión de trabajo escrito**

C. MARIO LEONCIO ARRIJOJA RODRÍGUEZ  
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
P R E S E N T E.-

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C.

**HÉCTOR DANIEL HERNÁNDEZ RAMOS**

La cual lleva el título de:


**"Estudio del proceso de deslignificación de madera para la maximización de la reducción de lignina"**

Y concluyen que se acepta.

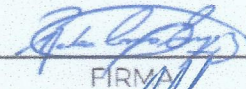
**ATENTAMENTE**

Excelencia en Educación Tecnológica®  
CIENCIA - TÉCNICA - CULTURA®

PRESIDENTE: DRA. LETICIA LÓPEZ ZÁMORA

  
FIRMA

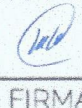
SECRETARIO: DRA. ROSALÍA CERECERO ENRÍQUEZ

  
FIRMA

VOCAL: DR. EUSEBIO BOLAÑOS REYNOSO

  
FIRMA

VOCAL SUP.: MC. MARÍA ELENA GARCÍA REYES

  
FIRMA

FTI-TI-013



Avenida Oriente 9 No. 852  
Col. Emiliano Zapata, C.P. 94320  
Orizaba, Veracruz, México.  
Teléfono: 272-110-53-60  
Email: [mciq@orizaba.tecnm.mx](mailto:mciq@orizaba.tecnm.mx)  
[www.orizaba.tecnm.mx](http://www.orizaba.tecnm.mx)



## Declaración

Yo, Héctor Daniel Hernández Ramos, certifico que esta tesis, que tiene una extensión de 104 cuartillas, ha sido escrita por mí y constituye el registro escrito del trabajo de tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química bajo la asesoría y dirección de Dra. Leticia López Zamora y no ha sido sometida en ningún otra institución previamente.

Fui admitido como estudiante de la maestría en Agosto 2019 y mi trabajo de tesis fue liberado para su impresión el 5 de marzo del 2021

También declaro que, al presentar esta tesis, el Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Orizaba tiene permiso para publicarla en formato electrónico bajo las regulaciones propias de la institución y que si existe algún acuerdo de confidencialidad de la información lo haré saber en forma escrita para que se omitan las secciones correspondientes.

Fecha: 5 de marzo de 2021

Firma: \_\_\_\_\_



Vo. Bo.

Asesor: Dra. Leticia López Zamora

Firma del asesor: \_\_\_\_\_



## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía, por guiarme para poder llegar hasta este punto de la vida, por haberme dado salud y bendición para permitirme culminar mis objetivos hasta este punto de vida.

A mis padres, por haberme apoyado en todo momento en mi formación, por su amor, sus consejos, sus valores, por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan, por el valor que muestran para salir adelante. Por la motivación constante que me ha permitido llegar hasta este momento y la confianza brindada para ser una buena persona.

A mi hermano, por su cariño y confianza, por soportarme diariamente, por todos esos momentos vividos a lado de nuestros padres que son aprendizajes y gratas experiencias.

A mis familiares, en especial a mis tías Soledad e Inés (QEPD), por todo el apoyo que me han brindado durante toda mi formación escolar, por sus valores inculcados, sus consejos y aprendizajes.

A mis abuelos (QEPD), en especial a mi abuelo Héctor, por todas esas tardes de pláticas que teníamos, de tus anécdotas, todas tus experiencias vividas, por tu cariño y confianza que tenías en mi hermano y en mí. Sé que estabas orgulloso de nosotros, y vernos llegar hasta este punto sin duda estarías feliz.

A la Doctora Leticia, por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo desde residencias y aceptar que continuara durante la Maestría, por su liderazgo y conocimiento, por su paciencia, por todo su apoyo brindado para poder llevar a cabo la experimentación necesaria para culminar el proceso.

A mis compañeros del laboratorio por su orientación y apoyo en el trabajo realizado a lo largo de la tesis.

A mis compañeros de generación durante la Maestría: Marco, Adolfo, Fede, Caty, Omar, José por todos aquellos momentos y experiencias vividos dentro del aula de clases y todos los que pasaron fuera de ella, fueron los mejores compañeros durante esta experiencia, así también a mis amigos y conocidos por todas las experiencias vividas hasta este momento, por su confianza y compañía brindada en especial a Eder, Eduardo (Ballos), Donaldo, Valeria, Anel, Adán, Adriana, Lily, Jessie, Daniel, Pablo, Diana, José Luis, Fortino, Sandra, Alfredo.

## RESUMEN

### Estudio del proceso de deslignificación de madera para la maximización de reducción de lignina

Elaborado por: Ing. Héctor Daniel Hernández Ramos

Dirigida por: Dra. Leticia López Zamora

Una gran parte de los materiales con alto contenido en celulosa son susceptibles de ser utilizados como materia prima para la producción de biocarburantes, se generan como residuos en los procesos productivos de los sectores agrícola, forestal e industrial que constituye una fuente abundante y de bajo costo, que genera, además, una solución al problema de su disposición final. La deslignificación es una etapa crucial previa a la obtención de bioetanol, al permitir acceder a la celulosa y lograr su transformación logrando la ruptura en su composición removiendo la hemicelulosa y buscando la mayor remoción en el porcentaje de lignina presente en el material a tratar.

En el presente trabajo se realizó la optimización del proceso de hidrólisis alcalina de residuos lignocelulósicos, empleando como materia prima una mezcla de residuos de madera (RM) y dos lotes de maderas puras: cedro (RM<sub>C</sub>) y pino (RM<sub>P</sub>), de la ciudad de Orizaba. Para obtener la optimización del proceso se partió de un diseño de superficie de respuesta Box-Behnken, consideraron como variables independientes: tiempo del proceso (30, 50 y 70 h), concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2, 4 y 6 % v/v) y Relación Sólido-Líquido (10, 15 y 20 g:mL), trabajando muestras de 5 g en recipientes de 1 L, a fin de favorecer un buen contacto entre la muestra y el líquido, dicho diseño sirvió como base para establecer un nuevo diseño en el cual se alcanzó la optimización en el proceso, donde las variables se mantuvieron siendo: tiempo del proceso (27, 38.5 y 50 h), concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6, 8 y 10 % v/v) y Relación Sólido-Líquido (12, 16 y 20 g:mL), siendo la variable de respuesta la remoción en el porcentaje de lignina. Los resultados fueron analizados estadísticamente, determinándose que las condiciones que minimizan el contenido de lignina en RM son 38.9 h, 8 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v/v y una RSL de 16 g: mL logrando una remoción de 42.5 % de lignina con un valor final de lignina de 8.8002 %. Una vez obtenida la optimización del proceso de hidrólisis alcalina se procedió a replicar el diseño óptimo utilizando maderas puras. Para los RM<sub>C</sub> las condiciones óptimas fueron: 38.1 h, 8.4 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v/v y RSL de 16.6 g:mL teniendo un valor de lignina de 8.0207 % con una remoción de 46.0865% con respecto a la caracterización lignocelulósica, mientras que para el RM<sub>P</sub> las condiciones óptimas fueron: 38.7 h, 8.2 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v/v y 18.4 g:mL de RSL obteniendo una remoción de 36.0537% con un valor de 9.0711 % final. Teniendo las condiciones óptimas para cada una de las muestras por separado se procedió a realizar una comparación sometiendo la muestra a una reducción en el tamaño de partícula, donde para RM<sub>C</sub> se obtuvo un porcentaje de lignina 8.1026 con una remoción de 45.54 %, y para RM<sub>P</sub> un porcentaje de lignina de 9.0323 teniendo una remoción de 36.34 %.

## ABSTRACT

### Study of the wood delignification process to maximize lignin reduction.

By: Ing. Héctor Daniel Hernández Ramos  
Advisor: Dra. Leticia López Zamora

A large part of the materials with a high cellulose content can be used as raw materials for the production of biofuels. They are generated as waste in the production processes of the agricultural, forestry and industrial sectors, which constitutes an abundant and low-cost source that also provides a solution to the problem of their final disposal. Delignification is a crucial stage prior to obtaining bioethanol, as it allows access to the cellulose and its transformation, achieving a break in its composition by removing the hemicellulose and seeking the highest percentage of lignin present in the material to be treated.

In this work, the alkaline hydrolysis process of lignocellulosic waste was optimized, using as raw material a mixture of wood waste (RM) and two lots of pure wood: cedar (RM<sub>C</sub>) and pine (RM<sub>P</sub>), from the city of Orizaba. In order to obtain the optimization of the process, a Box-Behnken response surface design was used, considering as independent variables: process time (30, 50 and 70 h), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration (2, 4 and 6 % v/v) and solid-liquid ratio (10, 15 and 20 g:mL), working 5 g samples in 1 L containers, in order to favour a good contact between the sample and the liquid. This design served as the basis for establishing a new design in which process optimization was achieved, where the variables were kept as follows: process time (27, 38.5 and 50 h), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration (6, 8 and 10 % v/v) and Solid-Liquid Ratio (12, 16 and 20 g:mL), the response variable being the removal of lignin in percentage. The results were analyzed statistically, determining that the conditions that minimize the lignin content in RM are 38.9 h, 8 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v/v and a RSL of 16 g:mL achieving a removal of 42.5 % lignin with a final lignin value of 8.8002 %. Once the optimization of the alkaline hydrolysis process was obtained, the optimal design was replicated using pure woods.

For the RMC the optimal conditions were: 38.1 h, 8.4 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v/v and a RSL of 16.6 g:mL having a lignin value of 8.0207 % with a removal of 46.0865 % with respect to the lignocellulosic characterization, while for the RMP the optimal conditions were: 38.7 h, 8.2 % of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v/v and 18.4 g:mL RSL obtaining a removal of 36.0537 % with a value of 9.0711 % final. Having the optimal conditions for each of the samples separately, a comparison was made by subjecting the sample to a reduction in particle size, where for RM<sub>C</sub> a percentage of lignin of 8,1026 was obtained with a removal of 45.54 %, and for RM<sub>P</sub> a percentage of lignin of 9,0323 with a removal of 36.34 %.

# INDICE

Resumen

Abstract

Lista de Figuras

Lista de tablas

Nomenclatura

Introducción

## **CAPÍTULO 1      Fundamentos Teóricos**

1.1	Biocombustibles	2
1.1.1	Panorama Mundial	3
1.2	Biocombustibles de primera generación	6
1.3	Biocombustibles de segunda generación	7
1.4	Biocombustibles de tercera generación	8
1.5	Bioetanol	8
1.5.1	Bioetanol como combustible	9
1.6	Beneficios del bioetanol	10
1.6.1	Ventajas	10
1.6.2	Desventajas	11
1.7	Materiales lignocelulósicos	12
1.8	Biomasa lignocelulósica	13
1.8.1	Celulosa	15
1.8.2	Hemicelulosa	15
1.8.3	Lignina	17
1.9	Madera	18
1.9.1	Clasificación de maderas	19
1.10	Hidrólisis	20
1.10.1	Hidrólisis ácida	21
1.10.2	Hidrólisis alcalina	22
1.10.3	Hidrólisis enzimática	22
1.11	Diseño de experimentos	23



1.11.1	Diseño de experimentos Box-Behnken	24
1.12	Antecedentes	25
<b>CAPÍTULO 2 Materiales y Métodos</b>		
2.1	Metodología general	30
2.2	Recolección de la materia prima	31
2.3	Acondicionamiento de la materia prima	31
2.4	Caracterización lignocelulósica	31
2.4.1	Humedad	32
2.4.2	Determinación de carbohidratos estructurales y lignina (NREL)	32
2.4.3	Determinación de lignina soluble	32
2.5	Hidrólisis	32
2.5.1	Pretratamiento ácido	32
2.5.2	Pretratamiento alcalino	33
2.6	Estudio del pretratamiento alcalino de maderas puras	34
2.7	Evaluación de maderas puras reduciendo el tamaño de partícula	35
2.8	Análisis de la materia prima e hidrolizados por HPLC	36
2.8.1	Análisis de datos a partir de HPLC para NREL	37
<b>CAPÍTULO 3 Resultados y Discusión</b>		
3.1	Caracterización Lignocelulósica	40
3.2	Hidrólisis alcalina de RM	40
3.3	Optimización del proceso de hidrólisis alcalina de RM	46
3.4	Proceso de hidrólisis alcalina utilizando maderas puras (RM <sub>c</sub> y RM <sub>p</sub> )	50
3.4.1	Estudio de la reducción de lignina en RM <sub>c</sub>	51
3.4.2	Estudio de la reducción de lignina en RM <sub>p</sub>	55
3.5	Evaluación de maderas puras reduciendo el tamaño de partícula.	60
	Conclusiones	
	Referencias Bibliográficas	
	Anexos	

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PAG
1.1	Estructura de los combustibles utilizados en México (SENER 2014, citado por Masera y Bustamante, 2017).	3
1.2	Mayores productores de biocombustibles en el mundo (Masera y Bustamante, 2017)	4
1.3	Proceso para la obtención de bioetanol de acuerdo a su materia prima utilizada (Álvarez, 2013)	6
1.4	Forma estructural de la celulosa (Medina-Morales <i>et al.</i> , 2011)	15
1.5	Estructura de azúcares encontrados en la hemicelulosa (Navarro, 2012)	16
1.6	Estructura de componentes de hemicelulosa (Navarro, 2012)	16
1.7	Estructura esquemática de la lignina (Prinsen, 2010).	17
1.8	Procesos de transformación de lignina (Lacerda, 2015)	18
1.9	Comparativa de maderas duras y blandas (Sánchez, 2018).	20
1.10	Modelo general de un proceso o sistema (Montgomery, 2013)	23
1.11	Representación de un diseño Box-Behnken de tres factores (Montgomery, 2013)	25
2.1	Metodología del proceso de optimización de hidrólisis alcalina	30
3.1	Gráficos de superficie de respuesta del proceso de hidrólisis alcalina sobre RM, etapa 1; a) Tiempo [h] vs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [%v/v]; b) Tiempo [h] vs RSL [g:mL] c) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [%v/v] vs RSL [g:mL]	43
3.2	Gráficos de superficie de respuesta del proceso de hidrólisis alcalina sobre RM, etapa 2; a) Tiempo [h] vs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [%v/v]; b) Tiempo [h] vs RSL [g:mL] vs; c) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [%v/v] vs RSL [g:mL].	45

3.3	Gráficos de superficie de respuesta del proceso de hidrólisis alcalina sobre RM para la optimización; a) Tiempo [h] vs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [%v/v]; b) Tiempo [h] vs RSL [g:mL]; c) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [%v/v] vs RSL [g:mL].	48
3.4	Gráficos de contornos del proceso de hidrólisis alcalina sobre RM para la optimización: a) Tiempo [h] vs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [%v/v]; b) Tiempo [h] vs RSL [g:mL]; c) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [% v/v] vs RSL [g:mL].	49
3.5	Gráficos de superficie de respuesta del proceso de hidrólisis alcalina sobre RM <sub>C</sub> ; a) Tiempo [h] vs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [%v/v]; b) Tiempo [h] vs RSL [g:mL]; c) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [%v/v] vs RSL [g:mL].	53
3.6	Gráficos de contornos del proceso de hidrólisis alcalina sobre RM <sub>C</sub> ; a) Tiempo [h] vs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [%v/v]; b) Tiempo [h] vs RSL [g:mL]; c) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [%v/v] vs RSL [g:mL].	54
3.7	Gráficos de superficie de respuesta del proceso de hidrólisis alcalina sobre RM <sub>P</sub> ; a) Tiempo [h] vs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [%v/v]; b) Tiempo [h] vs RSL [g:mL]; c) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [%v/v] vs RSL [g:mL].	56
3.8	Gráficos de contornos del proceso de hidrólisis alcalina sobre RM <sub>P</sub> ; a) Tiempo [h] vs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [%v/v]; b) Tiempo [h] vs RSL [g:mL]; c) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [%v/v] vs RSL [g:mL].	58

## LISTA DE TABLAS

TABLA		PAG
1.1	Panorama general de los biocombustibles (Mariante <i>et al.</i> , 2014)	7
1.2	Propiedades existentes entre la gasolina y el bioetanol (Mariante <i>et al.</i> , 2014)	11
1.3	Composición lignocelulósica de algunos materiales lignocelulósicos (Abril y Navarro, 2012)	14
1.4	Tipos de residuos de madera de acuerdo a la fuente de obtención (Sánchez, 2018).	21
2.1	Parámetros para la caracterización de los residuos lignocelulósicos	31
2.2	Variables para llevar a cabo la optimización de la hidrólisis alcalina	34
2.3	Ecuaciones para concentraciones de celulosa y hemicelulosa	37
3.1	Caracterización inicial del material lignocelulósico	40
3.2	Diseño Box-Behnken para el proceso de hidrólisis alcalina de RM, etapa 1	41
3.3	Diseño Box-Behnken para la etapa de hidrólisis alcalina para RM, etapa 2	44
3.4	Estructura del diseño Box Behnken para la optimización del proceso de hidrólisis alcalina de RM	47
3.5	Estructura del diseño Box Behnken para la optimización del proceso de hidrólisis alcalina utilizando $RM_C$ y $RM_P$	51
3.6	Condiciones óptimas de operación en la reducción de partícula para $RM_C$ y $RM_P$	60
3.7	Comparación de la remoción de lignina utilizando diferentes tipos de maderas.	62

# NOMENCLATURA

<b>Símbolo</b>	<b>Descripción</b>	<b>Unidades</b>
AIL	Lignina Insoluble en ácido	%
AIR	Residuo Insoluble en ácido	%
ASL	Lignina soluble en ácido	%
MmL	Miles de millones de litros	
RSL	Relación Sólido-Líquido	
ODW	Peso seco	g
% v/v	Porcentaje volumen-volumen	%
RM	Residuos de madera	g
RM <sub>c</sub>	Residuos de madera de cedro	g
RM <sub>p</sub>	Residuos de madera de pino	g

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la energía renovable es una tendencia global, que obliga a las personas a considerar una cartera amplia y competitiva de proyectos y medidas audaces, incluida la eliminación de barreras y la promoción de la energía renovable, así como otros factores que incluyan tecnología no fósil.

En la actualidad, se ha incrementado el uso de residuos agrícolas utilizados en la producción de combustibles y otros productos químicos porque son una de las principales fuentes de azúcares de hexosas y pentosas, el mayor índice, y por lo tanto se convierten en una de las prioridades para el desarrollo sostenible es la biomasa lignocelulósica. En México, dependiendo de la región, este tipo de material se suele encontrar debido a que el residuo es considerado renovable. Cada uno de estos materiales tiene una estructura compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, con residuos altos en lignocelulosa, como madera, maíz y café.

Para convertir la biomasa celulósica en azúcares fermentables y luego en etanol u otros productos de fermentación, el material debe ser pretratado primero para eliminar las partes de hemicelulosa y lignina presentes, que obstaculizan las enzimas celulasa responsables de realizar la hidrólisis de la celulosa. La eliminación de la fracción de hemicelulosa se realiza principalmente mediante tratamiento con ácido diluido, que hidroliza la hemicelulosa en unidades de pentosa solubles en agua. Estas pentosas también se han utilizado como materias primas en diversos procesos químicos y biológicos, por ejemplo en la producción de etanol y xilitol. La eliminación de la lignina se promueve mediante un tratamiento alcalino, disolviéndola. Las condiciones alcalinas también pueden cambiar la estructura cristalina de la celulosa y hacer que se hinche, promoviendo así la posterior hidrólisis de la celulosa.

El aprovechamiento de estos residuos surge a raíz de la necesidad de proteger el medio ambiente, preservar los recursos tanto renovables como no renovables y maximizar el potencial de uso de productos agrícolas, y en especial de los

subproductos que estos generan al someterlos a distintos procesos agroindustriales, cuya disposición final es un gran problema ambiental. Las apuestas en investigación están dirigidas al estudio e incursión de pretratamientos viables tanto en proceso como económicamente para este tipo de materias primas, y el uso de microorganismos, hongos y/o bacterias modificadas, combinadas, etc., para la potencialización de estas en la fermentación de azúcares y posterior obtención de bioetanol, por lo que debido a la gran variedad de residuos que no son aprovechados en la zona del estado de Veracruz. En este trabajo, se estudió el proceso de hidrólisis alcalina a partir de residuos de madera, previamente tratados con ácido diluido evaluando diferentes tiempos y concentraciones de agentes oxidativos buscando reducir la mayor cantidad de lignina presente en el material utilizado, obteniendo la caracterización en su composición lignocelulósica y la optimización en el proceso para posteriormente evaluar el estudio utilizando maderas puras, con el fin de que para procesos posteriores de fermentaciones enzimáticas buscando la mayor conversión de celulosa en azúcares fermentables y tener mejores rendimientos en una fermentación para la obtención de bioetanol.

# **CAPÍTULO 1**

## **FUNDAMENTOS TEÓRICOS**



## CAPITULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 1.1 Biocombustibles

El biocombustible es cualquier combustible producido directamente a partir de biomasa o su conversión, que puede reemplazar a los combustibles fósiles. El término biológico significa que su origen es biológico y por tanto renovable. Un ejemplo es el biogás, que es un combustible rico en metano que se obtiene a través de la digestión anaeróbica de residuos orgánicos, este biogás puede sustituir al gas LP. Como resultado, los biocombustibles pueden tener los siguientes beneficios:

- Es renovable ya que se puede procesar en grandes cantidades, lo que reduce la dependencia de los combustibles fósiles.
- Durante el ciclo de producción, las emisiones de CO<sub>2</sub> pueden neutralizarse durante el crecimiento de cultivos energéticos mediante la fotosíntesis.
- Reducen las emisiones de material particulado y dióxido de azufre de su combustión, incluidas otras sustancias que afectan la salud humana y el medio ambiente.

Con base en estos tres beneficios, los biocombustibles se convierten en una alternativa viable a los problemas energéticos y ambientales (Alejos y Calvo, 2015).

El uso de biocombustibles se remonta a la época en que los humanos descubrieron cómo hacer fuego y usar leña para cocinar o calentar. En el siglo XVIII, las principales ciudades de Europa y América usaban grasa vegetal o aceite de ballena para la iluminación. Después de 1860, cuando se utilizó queroseno en casas, la situación cambió. A principios del siglo XX, Rudolf Diesel (1858-1913), inventor del motor de combustión interna que lleva su nombre, desarrolló un prototipo de este motor que funciona con aceite de maní. Poco después, el aumento de la oferta de petróleo, sumado a su bajo costo y mejor desempeño de los hidrocarburos fósiles que hacen funcionar los motores Diesel, convirtió a este último en el principal combustible. En la década de 1970, debido a los conflictos en el Cercano Oriente, especialmente la crisis del mercado petrolero que ocurrió entre Israel y los países

árabes, los biocombustibles cobraron más importancia. A finales del siglo XX, la atención global al cambio climático, la reducción de los recursos fósiles y el propósito de asegurar la sostenibilidad energética llevaron al retorno de los biocombustibles, lo que condujo a la promoción específica de los biocombustibles. Produce. En México, el uso de combustibles fósiles sigue siendo muy común. En la Figura 1.1 se muestran los más utilizados, aunque por motivos medioambientales deberían consumirse en menor cantidad. (Ramos y Villar, 2016).

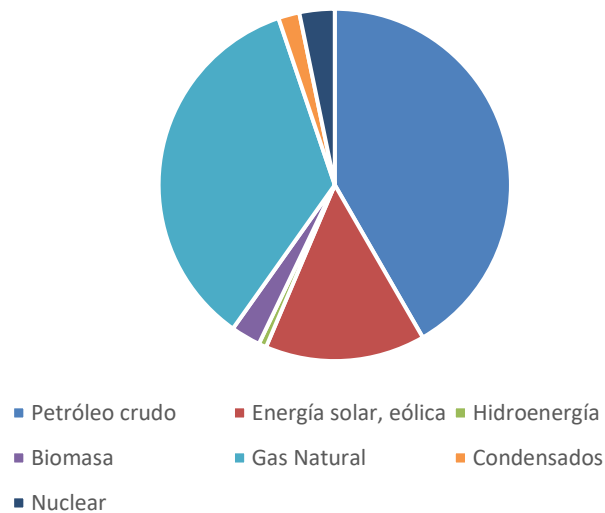


Figura 1.1. Estructura de los combustibles utilizados en México (SENER 2014, citado por Masera y Bustamante, 2017)

### 1.1.1 Panorama mundial

En la producción mundial de biocombustibles, el mayor potencial exportador es Estados Unidos, donde barreras mixtas limitan un mayor crecimiento de la demanda interna. En América del Sur, Brasil es el segundo mayor representante de la región, seguido de Argentina. En 2017, Estados Unidos aumentó la utilización potencial máxima de etanol a base de maíz, alcanzando el límite superior legal de 15 mil millones de galones, y estipuló regulaciones avanzadas más altas, y si se reducen las regulaciones, la celulosa obligatoria se verá reflejada en su totalidad, como se muestra en la Figura 1.2.

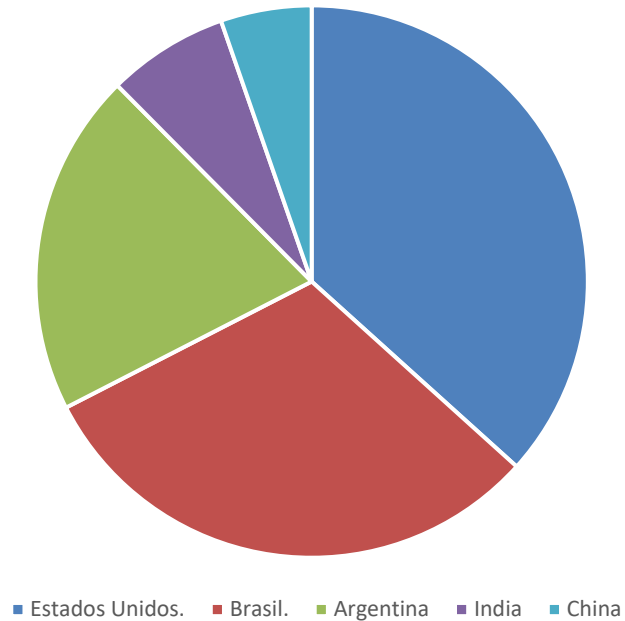


Figura 1.2. Mayores productores de biocombustibles en el mundo (Masera y Bustamante, 2017)

A pesar de las limitaciones de la barrera de mezcla, esto aún crea una fuerte demanda de etanol y biodiésel. En julio de 2016, la Comisión Europea emitió un mensaje sutil de que para 2020, los biocombustibles basados en alimentos ayudarán a reducir las emisiones de carbono en el sector del transporte. En febrero de 2017, la Comisión Europea propuso modificar la legislación europea. El límite superior de la proporción de energía renovable que el sector del transporte puede obtener de los cultivos alimentarios y forrajeros es del 3,8%, que es inferior al límite superior actual del 7%.

En el período de las perspectivas, se espera que la demanda de etanol de Brasil aumente en 6 MmL. Las regulaciones obligatorias de Brasil sobre biodiésel deberían llegar al 10% en 2019, lo que aumentará la producción en más del 40% en los próximos diez años. En Argentina, se asume que las regulaciones obligatorias de mezcla del 12% para biodiésel y etanol se alcanzarán en 2020. De manera similar, la producción de biodiésel en Argentina debe estar impulsada por la demanda de importaciones de Estados Unidos para cumplir con las regulaciones obligatorias

avanzadas. Al aumentar su participación en biocombustibles en un 20%, se espera que Tailandia se convierta en un actor importante en el mercado de biocombustibles. El gobierno Indio continuará apoyando la producción de etanol. En China, la producción de biocombustibles, principalmente a partir de maíz y yuca, debería aumentar en aproximadamente 1 MmL. Según estas previsiones, la producción mundial de etanol pasará de 120 ml en 2017 a 137 MmL en 2026. Se estima que para 2026, el 55% de la producción de etanol provendrá del maíz y el 35% de los cultivos de azúcar.

Por otro lado, la caída en la producción de petróleo ha hecho que el gobierno mexicano priorice las reformas energéticas para restaurar las reservas e incrementar la producción de crudo y gas natural. Sin embargo, la gente tiene serias dudas sobre el logro de estos objetivos, porque todavía existe un alto grado de incertidumbre sobre la verdadera escala de las reservas y la viabilidad económica y el impacto ambiental de su extracción. Para hacer la transición a un sistema energético que no dependa de combustibles fósiles, se requieren diferentes acciones coordinadas, que incluyen cambiar el modo de uso final de la energía (para iluminación, cocina, movilidad, etc.), mejorar la eficiencia energética, cambiar los hábitos de consumo de energía y usar energías renovables como la energía solar, energía eólica, energía geotérmica, energía oceánica y energía a partir de biomasa lignocelulósica. Según la materia prima, se suelen mostrar los pretratamientos necesarios para su procesamiento. (Figura 1.3). (Masera y Bustamante, 2017).

En la Tabla 1.1 se puede observar un panorama general de los biocombustibles la cual muestra una comparativa en cuanto a la producción, costo entre otras.

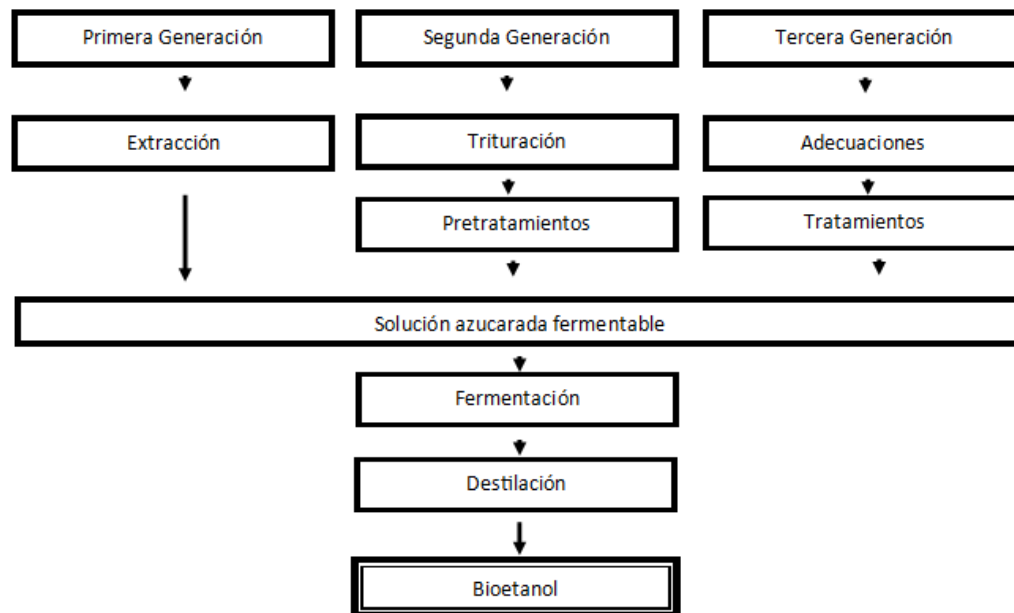


Figura 1.3 Proceso para la obtención de bioetanol de acuerdo a su materia prima utilizada (Álvarez, 2013)

## 1.2 Biocombustibles de primera generación

Este tipo de biocombustibles son aquellos insumos que son de procedencia agrícola y están conformados por las partes alimenticias de las plantas, las cuales tienen un alto contenido de almidón, azúcares y aceites. También se emplean como insumos a las grasas animales y elaboración de alimentos. Algunos ejemplos característicos de este tipo de clasificación son el jugo de caña de azúcar, granos de maíz, remolacha, sorgo dulce y algunos aceites como de palma, semilla de girasol entre otros. Son producidos empleando tecnología convencional como la fermentación (para azúcares y carbohidratos) y la transesterificación (para aceites y grasas). Entre los principales biocombustibles se encuentran el bioetanol y el biodiesel. Se puede encontrar diversas ventajas en estos biocombustibles como pueden ser su facilidad en su procesamiento y sus bajas emisiones de gases de efecto invernadero (Gómez y Ríos, 2013).

Tabla 1.1 Panorama general de los biocombustibles (Mariante *et al.*, 2014).

Biocombustible	Materia prima	Disminución de emisión de gases de efecto invernadero	Costo de la producción	Producción de biocombustible por hectárea	Tierras utilizadas
Bioetanol	Granos (trigo, maíz)	Moderado	Moderado	Moderado	Tierras fértiles
Bioetanol	Caña de azúcar	Alto	Bajo	Alto	Tierras fértiles
Biodiesel	Aceites de semillas (canola, soya, etc.)	Moderado	Moderado	Bajo	Tierras fértiles
Biodiesel	Aceite de palma	Moderado	Moderado a bajo	Moderado	Tierras húmedas

### 1.3 Biocombustibles de segunda generación

Los biocombustibles de segunda generación son aquellos que se producen como resultado del uso de técnicas en comparación con la primera que no conllevan el uso de materia utilizada para alimentación (Permingeat, 2017).

Se obtienen a partir de biomasa lignocelulósica. Esta biomasa procede de residuos de cultivos, de subproductos de la industria alimentaria y forestal, o de cultivos específicamente destinados a su obtención. Ejemplo de estos materiales se pueden encontrar los residuos de madera, desechos de maíz, trigo, arroz, o el bagazo de caña de azúcar. Estos residuos en su gran mayoría no tienen un valor económico, y se pueden encontrar de forma abundante y de rápido crecimiento en ciclos cortos, por lo que las tierras se pueden recuperar fácilmente para el uso que se considere

o dedicarlos específicamente a la producción de biomasa con fines energéticos. Su procesamiento es complejo debido a que estos cultivos se caracterizan por su alta densidad energética almacenada en la celulosa, para ello es común utilizar el proceso de hidrólisis para poder romper los enlaces químicos (Alejos y Calvo, 2015).

#### **1.4 Biocombustibles de tercera generación**

Los biocombustibles de tercera generación son insumos vegetales con una alta densidad energética almacenada en sus componentes químicos, por lo que reciben el nombre de cultivos energéticos, que pueden ser también modificados genéticamente.

La materia prima utilizada para este tipo de biocombustibles son las algas, productoras de fécula que se puede convertir en bioetanol, también productoras de pequeñas gotas de aceite el cual se puede aprovechar para la producción de biodiesel que para crecer no necesitan más que agua, luz solar y CO<sub>2</sub> que en comparación con otras materias primas, presenta algunas ventajas: presentan el crecimiento más rápido, pueden ser cultivadas durante todo el año y algunas especies son capaces de cuadruplicar su biomasa en un día. Los procesos de obtención de biocombustibles se encuentran en fase de estudio y desarrollo, sin embargo, se han llevado a cabo pruebas a nivel planta piloto (Álvarez, 2013).

#### **1.5 Bioetanol**

Las perspectivas de agotamiento de los combustibles fósiles sumado a la demanda creciente de energía, sitúan a los biocombustibles líquidos como una alternativa energética renovable, en el marco de la creciente valoración de combustibles que tengan bajo impacto en la emisión de carbono. El bioetanol constituye alrededor del 90% del biocombustible producido a nivel mundial. En la actualidad, hablar de la energía sin mencionar el uso de biocombustibles es casi impensable. Es por ello que una de las herramientas más aceptadas a nivel científico y social en la sustitución de los combustibles fósiles por energías alternativas, aquellas que ayuden a contrarrestar el problema de los aumentos en la temperatura del planeta

que influyen en los gases de efecto invernadero y los daños que tiene hacia el medio ambiente. El bioetanol es la alternativa más viable hoy en día; el consumo de estas nuevas alternativas disminuye las importaciones de energías fósiles como lo es el crudo y se contribuye al impulso de las diversas actividades tanto agrícolas como industriales y se mejora el grado de autosuficiencia de energía. Se denomina bioetanol al obtenido a partir de fuentes de biomasa vegetal; mieles y jugos ricos en sacarosa de fábricas azucareras, productos ricos en almidón y a partir de materiales lignocelulósicos. Cualquier material que contenga azúcares o hidratos de carbono fermentables, almidón, celulosa o hemicelulosa, puede servir como materia prima para la obtención de etanol (Navarro, 2012).

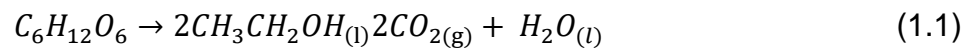
### **1.5.1 Bioetanol como combustible**

El Bioetanol es un biocombustible de origen vegetal que se produce a partir de la fermentación de materia orgánica rica en azúcar como puede ser la caña de azúcar, remolacha, vino, etc., así como también de la transformación en azúcar del almidón empleado que está presente en los diversos cereales. Estos azúcares se encuentran combinados en diferentes formas como la sacarosa, almidón, hemicelulosa, celulosa y lignina. Dependiendo de la materia prima utilizada para su producción se derivan diversos subproductos que son utilizados en diferentes industrias entre las cuales destacan la industria de la alimentación y de la energética. Se produce por la fermentación de los azúcares contenidos en la materia orgánica de las plantas. Se lleva a cabo un proceso en el cual se obtiene alcohol hidratado el cual tiene un contenido aproximado de 5% H<sub>2</sub>O, que posteriormente mediante una deshidratación puede ser empleado como combustible. El Bioetanol obtenido mezclado con la gasolina genera un biocombustible de alto poder energético, el cual tendrá características muy parecidas a las de la gasolina, pero tendrá una importante reducción en las emisiones contaminantes (Gracia, 2011).



Para que el Bioetanol contribuya al cien por ciento a las necesidades como combustible, necesita de un balance energético positivo, el cual se lleva a cabo mediante la consideración de algunas variables:

- Cantidad de energía contenida en el producto al final de la producción
- Cantidad de energía consumida directamente para la producción de etanol
- Calidad del Bioetanol resultante
- Energía consumida en la planta productora
- Almidón → Azúcar → Fermentación
- Mediante la fermentación directa de productos azucarados:



## 1.6 Beneficios del bioetanol

Hasta ahora parece que los biocombustibles parecen unos buenos sustitutos de los combustibles convencionales que perjudican a nuestro medio ambiente a causa de las grandes cantidades manejadas. El uso de bioetanol presenta diferentes ventajas, así como sus respectivas contras (Lara, 2015).

### 1.6.1 Ventajas

- Fuente de combustible renovable que reduce la dependencia del petróleo del extranjero
- Emiten un 40-80% menos de gases de efecto invernadero que los combustibles fósiles y son accesibles de almacenar
- Superior medioambientalmente al resto de los carburantes más importantes y reduce la formación de la lluvia ácida
- Disminución de residuos al llevar a cabo su producción

### 1.6.2 Desventajas

Para poder utilizar el bioetanol como combustible se necesitaría llevar a cabo algunas modificaciones con respecto al motor dentro de un vehículo y así no alterar significativamente el consumo.

- Aumentar la relación de compresión y variar la mezcla de combustible/aire
- Modificar el uso de bujías resistentes a mayores temperaturas y presiones
- Conductos resistentes al ataque de alcoholes
- Modificar para poder agregar un mecanismo o sistema que facilite el arranque en frío

En la Tabla 1.2 se presenta una comparativa entre las propiedades de la gasolina en comparación con el bioetanol.

Tabla 1.2 Propiedades existentes entre la gasolina y el bioetanol (Mariante *et al.*, 2014).

Parámetro	Unidad	Gasolina	Bioetanol
Poder calorífico	kJ/kg	43,500	28,225
Densidad	kg/L	0.72-0.78	0.792
Octanaje RON	-	90-100	102-130
Octanaje MON	-	80-92	89-96
Calor latente de vaporización	kJ/kg	330-400	842-930
Relación aire /combustible	-	14.5	9.0
Presión de vapor	kPa	40-65	15-17
Temperatura de ignición	°C	220	420

## 1.7 Materiales lignocelulósicos

El material lignocelulósico se refiere a toda la materia orgánica de árboles, plantas y desechos animales, que se puede convertir en energía o de la agricultura (maíz, café), de aserraderos (poda, ramas, serrín, corteza). Los materiales lignocelulósicos que se pueden utilizar para la producción de energía cubren una amplia gama de materiales y fuentes: las industrias forestal y agrícola, los desechos municipales y los residuos de las plantaciones de energía se utilizan comúnmente en los procesos de conversión modernos, incluida la generación de energía a gran escala, con énfasis en la sustitución de los combustibles fósiles. Además, es necesario darse cuenta de que el material se puede utilizar no solo para la producción de energía, sino también como materia prima para la producción de una variedad de sustancias químicas de gran valor comercial. (Sifontes y Domine, 2013).

Los materiales lignocelulósicos tienen una estructura compuesta principalmente por tres componentes (celulosa, hemicelulosa y lignina). Durante la degradación de los materiales lignocelulósicos, se pueden identificar algunos métodos de tratamiento comunes para la producción de azúcares fermentables. Estos tratamientos pueden ser físicos, químicos, enzimáticos o microbianos. Asimismo, la viabilidad de cada tratamiento depende del consumo de energía, la selectividad, el costo del proceso y la tasa de degradación.

La estructura química, el grado de los componentes del material lignocelulósico y la composición principal están relacionados con sus materiales de origen. Asimismo, la estructura de los materiales lignocelulósicos determina sus propiedades mecánicas, la resistencia a los ataques de microorganismos, enzimas y agentes químicos, y determina la dificultad de degradar dichos materiales. Por lo tanto, se puede garantizar que las propiedades del sustrato y el método de pretratamiento utilizado afecten a la eficiencia de degradación del material lignocelulósico. (González y García, 2013).

## 1.8 Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es una biomasa vegetal compuesta principalmente por una matriz polimérica, y sus componentes principales son celulosa, hemicelulosa y lignina. En este caso no se incluye la biomasa compuesta principalmente por almidón, proteínas y azúcar, como cereales, cereales, miel, etc. La biomasa derivada de lignocelulosa es la materia orgánica más abundante en la tierra. Sus fuentes son bosques, cultivos, residuos de cultivos y otros residuos industriales, como residuos de la industria de la madera y cartón, residuos de la industria del papel y papel reciclado. Las aplicaciones iniciales de la biomasa derivada de la lignocelulosa se utilizaron principalmente como combustible, construcción y alimentación animal. (González y García 2013).

Hoy en día, se usa ampliamente y forma la base de muchas industrias, como la de celulosa y la fabricación de papel, la obtención de productos químicos, materiales compuestos, materiales de construcción, combustibles líquidos y gaseosos, etc. Los materiales lignocelulósicos tienen las ventajas de ser biodegradables y renovables, que es el resultado de la fotosíntesis de las plantas a través de la energía solar. Con este método, su uso como combustible representa una forma sostenible y respetuosa con el medio ambiente de utilizar la energía solar. (Abril y Navarro, 2012).

La biomasa lignocelulósica se puede clasificar, atendiendo a su origen, en: Biomasa Vegetal, Animal y Residual.

- La Vegetal La incluyen toda la biomasa derivada de hortalizas. Incluye biomasa lignocelulósica y productos agrícolas que contienen azúcar, almidón y proteínas, como cereales, frutas, etc.
- Biomasa natural: Es un tipo que se produce en ecosistemas naturales. Este desarrollo intensivo de recursos es incompatible con la protección del medio ambiente
- Biomasa residual: Es toda la materia orgánica desperdiciada de los seres vivos por medios naturales o la intervención de tecnología humana. Incluye

residuos forestales y agrícolas, residuos sólidos urbanos y residuos biodegradables (residuos de ganado y aves, lodos, aguas residuales entre otros). Los residuos orgánicos, que generalmente se consideran un subproducto, pueden ganar un valor muy importante en el proceso de producción.

Cultivos energéticos son los realizados con el único objeto de su aprovechamiento energético y se caracterizan por una gran producción de materia viva por unidad de tiempo (Abril y Navarro, 2012).

En la Tabla 1.3, se presentan algunos materiales lignocelulósicos con su respectiva composición lignocelulósica.

Tabla 1.3 Composición lignocelulósica de algunos materiales lignocelulósicos (Abril y Navarro, 2012)

<b>Material Lignocelulósico</b>	<b>Celulosa (%)</b>	<b>Hemicelulosa (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>
Madera dura	40-55	24-40	18-25
Madera suave	45-50	25-35	25-35
Cáscara de nuez	25-30	25-30	30-40
Olote de maíz	45	35	15
Desechos de pastos	25-40	35-40	18-30
Papel	85-99	0	0-15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-20	80-85	0
Algodón	80-95	0	0
Papel periódico	40-55	25-40	18-30

### 1.8.1 Celulosa

La celulosa está compuesta por dos moléculas de glucosa conectadas y esterificadas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4. Estas moléculas de azúcar están conectadas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones susceptibles a la degradación enzimática.

La mayoría de los carbohidratos que existen en la naturaleza existen en forma de polisacáridos, que no solo están compuestos por azúcares unidos por enlaces glicosídicos, sino que también pueden contener estructuras poliméricas de azúcar unidas con aminoácidos, péptidos, proteínas, lípidos y otras estructuras mediante enlaces covalentes, como se muestra en la Figura 1.4. (Medina-Morales et al., 2011).

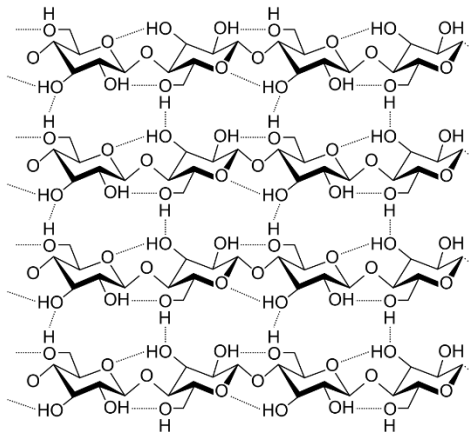


Figura 1.4 Forma estructural de la celulosa (Medina-Morales *et al.*, 2011)

### 1.8.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un grupo de heteropolisacáridos compuestos por cadenas de azúcar cortas y ramificadas. Entre ellas, pentosas (generalmente D-xilosa y L-arabinosa), hexosas (como D-galactosa, D-glucosa y D-Manosa), las cuales se muestran en la Figura 1.5. Se producen al combinarse estrechamente con celulosa y lignina y contribuyen a la rigidez de las paredes celulares de las plantas. La

hemicelulosa representa aproximadamente el 20-30% de la masa total de plantas anuales y perennes.

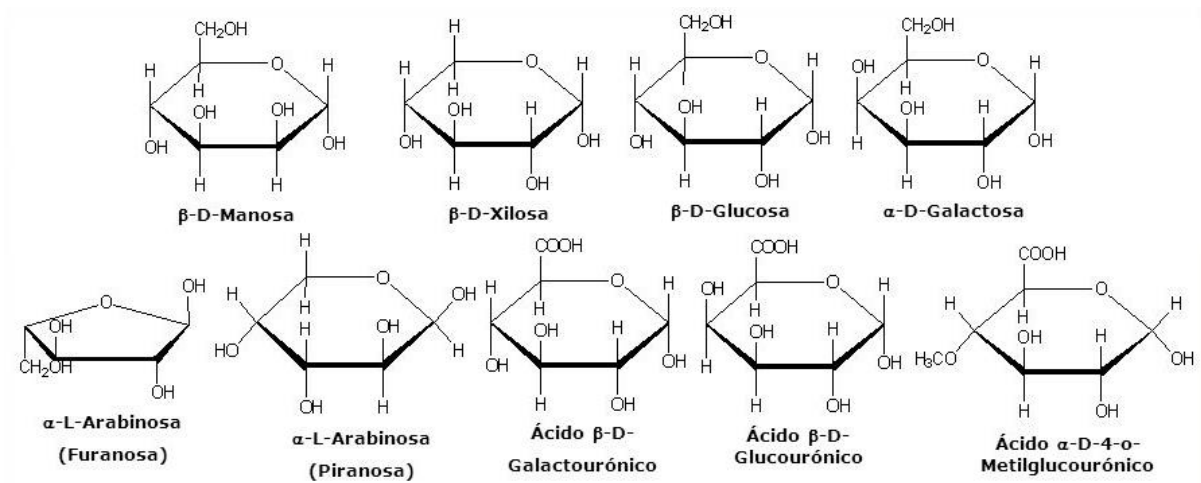


Figura 1.5 Estructura de azúcares encontrados en la hemicelulosa (Navarro, 2012)

El peso molecular de este polímero es menor que el de la celulosa y contiene ramificaciones con cadenas laterales cortas de diferentes azúcares mostradas en la Figura 1.6 fácilmente hidrolizables (Navarro, 2012).

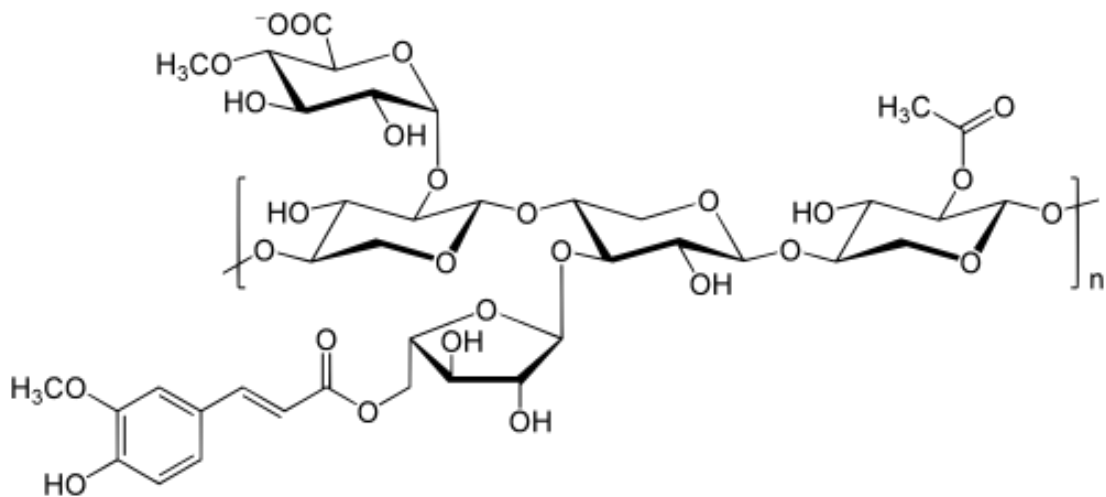


Figura 1.6 Estructura de componentes de hemicelulosa (Navarro, 2012)

### 1.8.3 Lignina

Se trata de un polímero tridimensional amorfo formado por la polimerización de unidades de fenilpropano que implica la formación de diferentes tipos de enlaces que se alternan de manera desordenada visualizados en la Figura 1.7. La mayoría de la lignina se encuentra situada en el espacio intercelular y en la pared primaria de la célula. Comienza en el espacio intercelular y se deposita a lo largo del ciclo de vida de la célula. Existen enlaces covalentes entre la cadena de lignina y los componentes de celulosa y hemicelulosa, mejorando así la fuerza de unión entre las fibras de celulosa y lignina. (Lacerda, 2015).

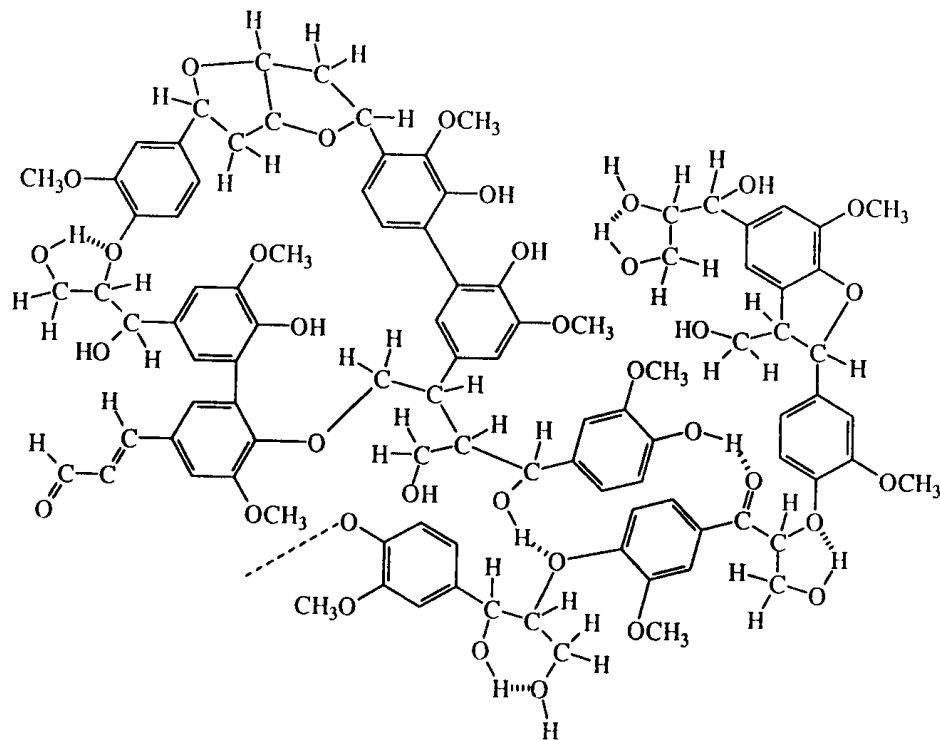


Figura 1.7 Estructura esquemática de la lignina (Prinsen, 2010)

El objetivo principal de la lignina es proporcionar a las plantas soporte estructural, impermeabilidad y resistencia al ataque microbiano o al estrés oxidativo. Este polímero es insoluble en agua y ópticamente inerte, en general dificulta la degradación de la lignina, lo que requiere la aplicación de varios tipos de



pretratamientos para eliminar el mayor porcentaje posible (Figura 1.8) (Prinsen, 2010).

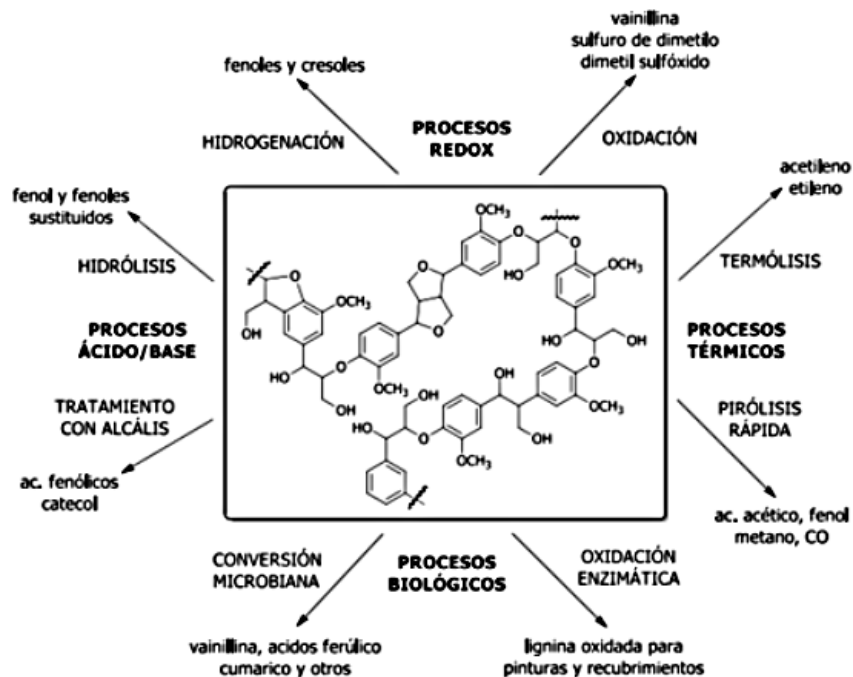


Figura 1.8 Procesos de transformación de lignina (Lacerda, 2015)

## 1.9 Madera

La madera es un material que se extrae de los troncos existentes debajo de la corteza de árboles y arbustos con estructuras fibrosas. Sus características principales tienen un contenido de celulosa de aproximadamente del 50%, la dureza y protección de la lignina es de aproximadamente el 25% y el contenido de hemicelulosa es de aproximadamente el 25%. (Sánchez, 2018).

México tiene una gran cantidad de especies forestales y ocupa el cuarto lugar entre los 17 llamados "países megadiversos". El país tiene 138 millones de hectáreas de vegetación forestal, equivalente al 70% del territorio del país, 64,9 millones de hectáreas de esta tierra pertenecen a bosques y selvas. En el país, la producción anual de madera es de unos 8 millones de m<sup>3</sup>. De esta, el 70% se utiliza en la

industria del aserradero, generando aproximadamente 2,8 millones de m<sup>3</sup> de residuos, principalmente aserrín, virutas y cortezas.

Por su cobertura forestal, el estado de Durango es considerado uno de los principales productores de residuos de madera. La tasa de participación de la entidad es 32.8%; otros estados con menor participación son Chihuahua (16.79%), Michoacán (7.76%), Oaxaca (7.13%) y Veracruz (4.93 %) (Téllez et al., 2017)

### **1.9.1 Clasificación de maderas**

De acuerdo a la obtención de la madera y a sus diferentes propiedades se puede clasificar en dos tipos:

- Maderas duras, son aquellas provenientes de árboles de crecimiento lento (árboles de hoja caduca), por lo que son más pesados y pueden soportar mejor el mal tiempo. La madera proviene de árboles que tardan décadas o incluso siglos en alcanzar la madurez suficiente. Pueden ser ampliamente utilizados en la construcción y fabricación de armarios porque pueden producir muebles de alta calidad, pueden soportar bien el paso del tiempo, tienen mayor dureza y son más estéticos que la madera blanda.
- Maderas blandas, las cuales tienen un periodo de crecimiento mucho más corto, que provoca que su precio sea mucho menor. La vida útil de esta madera no es tan buena como la de la madera dura. Dar forma a este tipo de madera es mucho más fácil. Son maderas ligeras, económicas y de fácil acceso. Como desventaja, poseen menor durabilidad y menor atractivo, (generalmente tratadas con pintura, barniz o tintes), y se rompen fácilmente durante su manipulación. (Sánchez, 2018).

La distribución de las células de madera dura puede tener un impacto significativo en la textura de la madera, el cual se puede observar en la Figura 1.9. La madera de anillo poroso tiene un anillo de base grande y claro en la madera blanda, y organización celular y fibras densas en la madera dura.

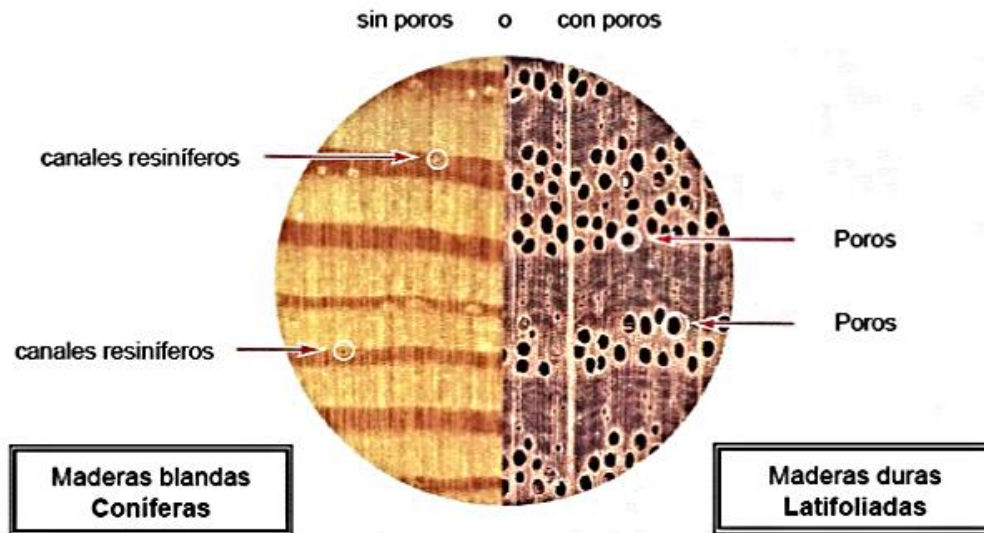


Figura 1.9 Comparativa de maderas duras y blandas (Sánchez, 2018)

También es común buscar residuos de madera, que pueden provenir de la actividad forestal, como la tala, los residuos forestales, etc. Estos desechos son difíciles de reutilizar, por lo que no tienen un propósito específico y se pueden encontrar en grandes cantidades. Se pueden dividir en dos categorías, una es de tala y extracción, y la otra es descartada por la industria durante el proceso de fabricación de la madera. La producción real de residuos o desperdicios, producidos con la fabricación de productos madereros, es distinta de una instalación a otra y depende de varios factores, que van desde las propiedades de la madera al tipo, funcionamiento y mantenimiento de la industria elaboradora. En la Tabla 1.4 se pueden observar los tipos de residuos encontrados (Sánchez, 2018).

### 1.10 Hidrólisis

La hidrólisis o sacarificación consiste en la rotura de los carbohidratos, presentes en los materiales lignocelulósicos (celulosa y hemicelulosas), en sus azúcares individuales (glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, etc.).

Tabla 1.4 Tipos de residuos de madera de acuerdo a la fuente de obtención (Sánchez, 2018)

FUENTE	TIPO DE RESIDUO
Operaciones forestales	Ramas, agujas, hojas, raíces, madera, aserrín.
Aserrío	Corteza, aserrín, recortes, madera partida, viruta.
Producción de tableros	Corteza, aserrín, recortes, lijaduras.
Producción de partículas	Cortezas, menudos, aserrín, lijaduras.

La hidrólisis se puede promover química o enzimáticamente. Al utilizar materiales lignocelulósicos, el pretratamiento es un paso necesario para obtener azúcares fermentables en la etapa de hidrólisis. El propósito del pretratamiento es separar la lignina de la celulosa y la hemicelulosa, para que los carbohidratos sean absorbidos más fácilmente por las enzimas hidrolíticas. (Jaramillo, 2013).

### 1.10.1 Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida es un método de pretratamiento de materiales lignocelulósicos, que busca principalmente dos objetivos. Primero, busca destruir la estructura celular del material para exponer la celulosa para promover la acción de enzimas o ácidos en el proceso de hidrólisis. Como segundo propósito, la hemicelulosa debe hidrolizarse a xilosa y / o sus correspondientes monómeros. Básicamente, dos hidrolizados ácidos de xilosa y glucosa, hemicelulosa y celulosa, pueden fermentarse en el proceso posterior para finalmente obtener etanol. (Sánchez et al., 2010).

Mediante este pretratamiento se obtiene una solución rica en xilosa y residuos sólidos que contienen celulosa y lignina. En el pretratamiento ácido, se sabe que la parte de lignina no se elimina por completo, por lo que se requiere otro

pretratamiento para lograr una mayor tasa de remoción en la superficie (Morales, 2015).

### **1.10.2 Hidrólisis alcalina**

La hidrólisis alcalina se lleva a cabo con soluciones diluidas de NaOH, produciendo una reacción de saponificación rompiendo los enlaces de tipo éster que unen la hemicelulosa con la lignina. La porosidad del material lignocelulósico aumenta, gracias a la hinchazón que provoca el tratamiento con NaOH (Pezoa, 2010).

Los tratamientos alcalinos, producen un hinchamiento de la biomasa, lo que conduce un aumento en el área superficial interna, un descenso de la cristalinidad, lo que permite el rompimiento en la estructura de la lignina (López *et al.*, 2013).

### **1.10.3 Hidrólisis enzimática**

En la hidrólisis enzimática, la sacarificación de la celulosa se lleva a cabo enzimáticamente mediante celulasas, las cuales producen la ruptura de las cadenas poliméricas de la celulosa y la hemicelulosa, que previamente han sido modificadas estructuralmente mediante un pretratamiento. A partir de la celulosa se obtiene glucosa, mientras que a partir de la hemicelulosa se obtienen diferentes monosacáridos, tales como la xilosa, glucosa, arabinosa, galactosa, y manosa. La principal ventaja de este tipo de hidrólisis es que no presenta problemas de corrosión.

El procedimiento más común consiste en poner en contacto la disolución de enzima con la muestra del sustrato lignocelulósico, manteniendo el pH, la temperatura y la homogeneidad de la mezcla durante todo el proceso. Los factores que afectan a la hidrólisis enzimática son: el tipo de sustrato, la actividad celulasa y las condiciones de reacción: temperatura y pH (Parameswaran y Raveendran, 2011).

### 1.11 Diseño de experimentos

El diseño experimental es un modelo estadístico, cuya finalidad es averiguar si determinados factores inciden en la variable de interés, y si existe influencia de un determinado factor se cuantifica dicha influencia.

La metodología de diseño experimental estudia cómo cambiar las condiciones habituales para realizar un proceso empírico para aumentar la posibilidad de descubrir cambios importantes en la respuesta; de esta manera, se puede comprender mejor el comportamiento del proceso objetivo. En este proceso se involucran diferentes tipos de variables, controlables e incontrolables, y estas variables tendrán influencia en las correspondientes variables de respuesta. mostrada en la Figura 1.10.

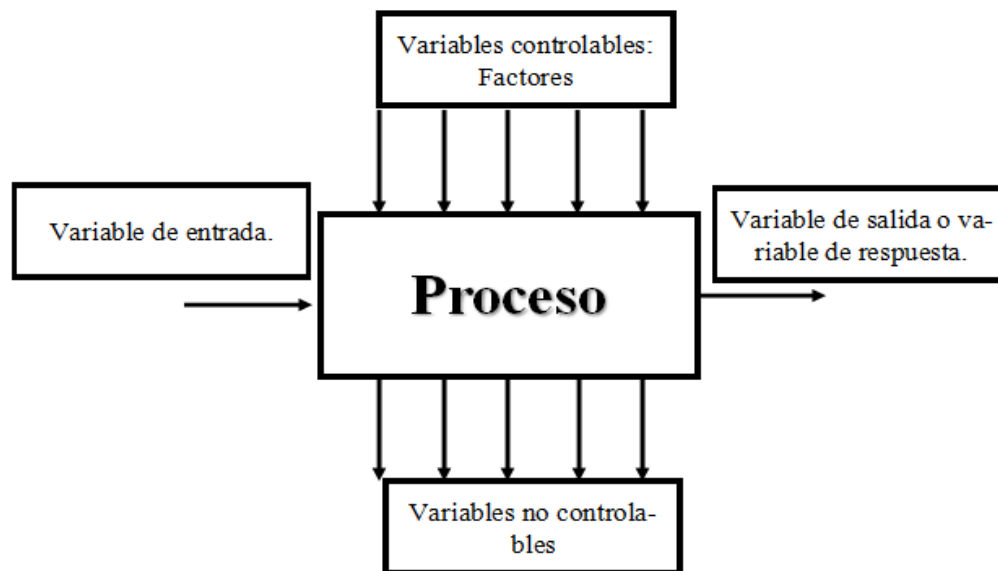


Figura 1.10 Modelo general de un proceso o sistema (Montgomery, 2013)

Hay muchas razones para realizar un diseño de experimentos, las cuales se enumeran a continuación:

- Determinar las principales causas de variación en la respuesta
- Encontrar las condiciones experimentales con las que se consigue un valor extremo en la variable de interés
- Comparar las respuestas en diferentes niveles de observación de variables controladas
- Obtener un modelo estadístico-matemático que permita hacer predicciones de respuestas futuras

En el diseño experimental, pueden ocurrir diversos errores durante el análisis estadístico, los más importantes encontrados se muestran en los siguientes puntos:

- Inconsistencia de datos. Estos cambios pueden afectar los datos, haciendo que la información no sea confiable
- Variables con fuerte correlación. En el proceso pueden aparecer dos o más variables altamente correlacionadas, lo que puede causar confusión
- Rango de las variables controladas limitado. Si el alcance de una de las variables importantes e influyentes en el proceso es pequeño, no hay forma de conocer su impacto fuera del alcance, y su relación con la variable de interés o cambios en la relación fuera del alcance pueden verse afectados. (Montgomery, 2013)

### 1.11.1 Diseño de experimentos Box-Behnken

Box y Behnken han propuesto algunos diseños de tres niveles para ajustar la superficie de respuesta. Estos diseños se forman combinando factoriales de  $2^k$  con diseños de bloques incompletos. Los diseños resultantes son generalmente muy eficientes en términos del número de corridas requeridas, y son rotativos o casi rotativos. Observe que el diseño de Box-Behnken es un diseño esférico, con todos los puntos en una esfera de radio  $\sqrt{2}$ . Además, el diseño de Box-Behnken no contiene ningún punto en los vértices de la región del cubo creado por los límites superior e inferior para cada una de las variables. Esto podría ser ventajoso cuando

los puntos en las esquinas del cubo representan combinaciones de nivel de factor que son prohibitivamente caras o imposibles de probar debido a las limitaciones del proceso físico (Montgomery, 2013). En la Figura 1.11, se puede apreciar la configuración de un diseño Box Behnken de tres factores.

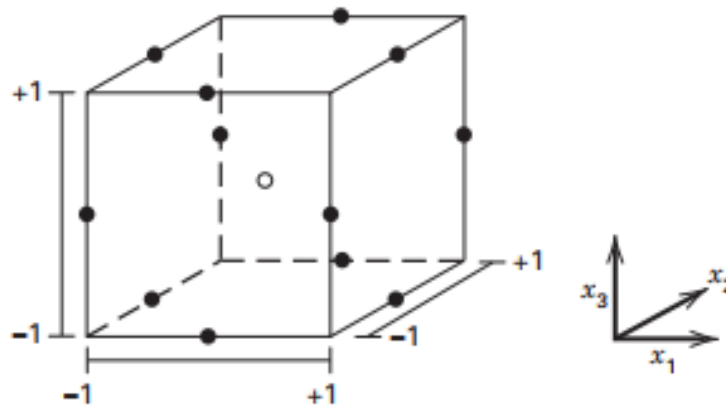


Figura 1.11. Representación de un diseño Box-Behnken de tres factores (Montgomery, 2013)

### 1.12 Antecedentes

Dhimas *et al.*, (2014), estudiaron que en todos los procesos de conversión termoquímica factibles, la hidrólisis ácida concentrada se ha utilizado para romper eficazmente la estructura cristalina de la celulosa y aumentar el rendimiento del proceso de fraccionamiento de biomasa lignocelulósica. Estudiando los efectos de la descristalización sobre la concentración de ácido sulfúrico (65-80% en peso), la temperatura de hidrólisis (80 ° C y 100 ° C) y el tiempo de reacción de hidrólisis (2 h) para optimizar las condiciones del proceso y los tipos de biomasa (roble, pino) madera y racimos de frutas (EFB) aceite de palma para la recuperación de azúcar. En la condición óptima del proceso, 78–96% de azúcares extraíbles teóricamente se han fraccionado mediante hidrólisis concentrada con ácido sulfúrico de las tres especies de biomasa diferentes con 87–90 g / L de concentración de azúcar en el hidrolizado y la más alta recalcitancia de pino (madera blanda) se determinó por la



correlación del índice de cristalinidad y el rendimiento de azúcar considerando la severidad de la reacción.

Stoffel *et al.* (2016) realizaron la integración de materiales lignocelulósicos, especialmente virutas de pino de la región NEA, para aplicar un proceso de fraccionamiento rentable y poco contaminante para obtener productos de alto valor. Para ello, se diseñó un proceso de fraccionamiento en tres etapas: alcalina (eliminación de extractos) -ácido (extracción de hemicelulosa) -alcalina (deslignificación). Cada etapa de la investigación implica un diseño experimental para evaluar los efectos de la temperatura, el tiempo y la concentración de reactivo en el proceso. La primera etapa alcalina suave se optimizó para encontrar las condiciones que maximizarían la eliminación de extractos de la madera y minimizarían la disolución de carbohidratos estructurales. La secuencia de fraccionamiento más adecuada para el aserrín de pino de acuerdo a los resultados de este trabajo, consiste en la aplicación de una etapa alcalina (90°C, 1 h y 5 % de NaOH sobre base seca) de desresinación, seguida de una etapa de explosión de vapor (200°C, 3% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 5 min) para extraer las hemicelulosas y un post tratamiento con oxígeno en medio alcalino. El material lignocelulósico resultante tiene gran potencial para la producción de bioetanol dado su alto contenido de hexosas.

Urrelo *et al.*, (2016), caracterizó la composición química en la especie Tajibo Morado, (*Tabebuia impetiginosa* "Mart. ex DC) Standley, procedente de la Comunidad Campesina Ocho Hermanos, del Municipio Carmen Rivero Torrez, del Departamento de Santa Cruz de la Sierra, aplicando metodologías y protocolos normalizados (TAPPI). Se extrajeron 3 trozos de 30 cm de alto por cada árbol de muestreo, obteniéndose un total de 9 rodajas. Los resultados muestran una media de 45.22% de Celulosa, lignina 32.07% y hemicelulosa 22.69%, en los extractos con etanol-benceno fue de 2.27%. La valoración del contenido de humedad dio una media de 15.44% y un pH de 5.22. En ceniza se obtuvo un valor medio de 1.31%, los porcentajes de minerales fueron: fósforo 0.011%, calcio 0.22%, magnesio 0.12%, potasio 0.013%, sodio 0.060%.

Jaramillo *et al.*, (2017), determinaron los efectos de diferentes pretratamientos químicos sobre la composición química y cristalinidad de materiales lignocelulósicos, aserrín de madera, bagazo y cascarilla de arroz. El pretratamiento evaluado se realizó aplicando ácido sulfúrico o hidróxido de sodio y una combinación de ambos sobre el material. Mediante la aplicación de un pretratamiento combinado, produce la mayor tasa de eliminación de lignina. Para bagazo de caña se obtuvo una remoción de lignina del 80,6%, mientras que para aserrín y cascarilla de arroz la remoción fue del 46.7%. Sin embargo, se observó una pérdida apreciable de celulosa, del 30,7% para el bagazo y 15.58% para la cascarilla. El análisis por difracción de rayos X, reveló un incremento de la cristalinidad para el aserrín y el bagazo de caña.

Rodríguez *et al.*, (2017) evaluaron el efecto de distintas condiciones de pretratamiento secuencial ácido-base de aserrín de pino, sobre la liberación de azúcares reductores en la etapa de sacarificación. El material lignocelulósico se pretrató en dos etapas: la primera, se realizó con ácido sulfúrico (PT1) y la segunda con hidróxido de sodio (PT2), ambas con tres niveles: 1, 2 y 3 % mediante un diseño 3<sup>2</sup> factorial. La hidrólisis enzimática se realizó a 50 °C y 150 rpm en frascos de 50 mL. Se tomaron muestras a las 0.15, 24, 48, 72 y 96 h. Se determinó el porcentaje de lignina ácido soluble y la concentración de azúcares reductores. El nivel óptimo de cada factor que favoreció la mayor deslignificación correspondió a 3 % de ácido sulfúrico y 3 % de hidróxido de sodio. La producción de azúcares reductores no se vio afectada por el PT2, pero sí por el PT1, alcanzando un máximo para el nivel 0 del mismo (2% de ácido sulfúrico). Se optimizó el pretratamiento secuencial ácido-base y se comprobó además que éste mejora la hidrólisis enzimática respecto al aserrín de pino sin pretratar.

Benítez *et al.*, (2018) el residuo utilizado en este caso proviene del pino. La deslignificación es la etapa clave antes de obtener el bioetanol, ingresar a la celulosa y lograr su conversión. En este trabajo se estudiaron las mejores condiciones para lograr la deslignificación de aserrín de pino patula cultivado en el Cáuco, la deslignificación óptima se logró mediante el uso de hidróxido de sodio al

12%, un tiempo de reacción de 60 minutos y el uso de mallas. Primeras condiciones. 30 (600  $\mu\text{m}$ ), el porcentaje de celulosa obtenible está entre 63% y 72%, y el porcentaje de muestras hidrolizadas está entre 10% y 15%.

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Metodología general

En la Figura 2.1 se muestra de manera general el proceso completo a seguir durante esta investigación para lograr la optimización del proceso de hidrólisis alcalina de una mezcla de residuos de maderas (RM), como también la comparativa utilizando un solo tipo en específico de madera: cedro (RM<sub>C</sub>) y pino (RM<sub>P</sub>).



Figura 2.1 Metodología del proceso de optimización de hidrólisis alcalina

## 2.2 Recolección de la materia prima

Durante el desarrollo de la investigación se trabajó con residuos lignocelulósicos de madera. Se utilizó una mezcla de residuos de maderas (RM), de especie de pino y de cedro. Los residuos lignocelulósicos fueron recolectados de una carpintería situada en la ciudad de Orizaba, Ver. Toda esta materia prima fue obtenida completamente seca y libre de cualquier otra materia ajena. Ambos residuos al ser recolectados se sometieron a un tratamiento físico como lo fue la trituración, esto con el fin de que los pretratamientos tanto ácidos como alcalinos incrementen su eficiencia al llevar a cabo la experimentación.

## 2.3 Acondicionamiento de la materia prima

Los residuos con los que se trabajará fueron seleccionados debido a su contenido de materia orgánica lignocelulósica. El tamaño del material lignocelulósico de madera, se encuentra en un grosor de partícula grande, por lo que tuvo que ser triturado en una licuadora para poder reducir el tamaño de la partícula para hacer que los pretratamientos ácido y alcalino vieran su efecto significativo teniendo como parámetro el tamaño de malla de tamices para su reducción.

## 2.4 Caracterización lignocelulósica

La caracterización de cada uno de los residuos lignocelulósicos, así como la de las mejores condiciones de cada material en el pretratamiento consiste en un análisis composicional para determinar el porcentaje de humedad, contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina, estas se encuentran especificadas en la Tabla 2.1

Tabla 2.1 Parámetros para la caracterización de los residuos lignocelulósicos

Prueba	Método	Anexo
Humedad	Termobalanza	A
Hemicelulosa	Determinación de carbohidratos estructurales y lignina (NREL)	B
Celulosa y lignina	Determinación de carbohidratos estructurales y lignina (NREL)	B

### **2.4.1 Humedad**

El contenido de humedad se determinó colocando 1 g ( $\pm 0.5$  g) de cada uno de los residuos lignocelulósicos en una termo-balanza AMB-50 iniciando el análisis de la materia prima hasta que el equipo indicara el fin de la prueba. Se realizó este proceso por duplicado para tener mayor certidumbre en el resultado mostrado en el Anexo A

### **2.4.2 Determinación de carbohidratos estructurales y lignina (NREL)**

Para la determinación de carbohidratos estructurales y lignina en la biomasa se llevó a cabo un procedimiento analítico en el laboratorio de Cristalización y generación de Biocombustibles “sección Plantas Piloto” ubicado dentro del Instituto Tecnológico de Orizaba utilizando la técnica recomendada por NREL (National Renewable Energy Laboratory) procedente del laboratorio nacional de los EE.UU. Departamento de Energía. (Sluiter *et al.*2012) como se muestra en el Anexo B.

### **2.4.3 Determinación de lignina soluble**

El contenido de lignina soluble en ácido se determinó sobre la fase líquida que se obtiene al llevar a cabo la técnica NREL, el cual se analizó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 240 nm que es la adecuada para este tipo de material que se utiliza.

## **2.5 Hidrólisis**

### **2.5.1 Pretratamiento ácido**

Para este proceso se replicaron las condiciones óptimas propuestas por Morales (2019), las cuales indican que con un tiempo de operación de 30 min, concentración de  $H_2SO_4$  de 3.45 % v/v y RSL de 3.36 p/v, se alcanzan los valores óptimos del proceso. Se trabajaron muestras de 250 g utilizando un vaso de precipitado de 2 L.

Se hidrolizó el residuo lignocelulósico. El tratamiento inicia con la preparación de una solución de  $H_2SO_4$ , la cual debe mezclarse con el residuo a fin de obtener un

contacto previo al proceso del autoclave, la Relación Líquido-Sólido (RLS) establecida para este tratamiento debe ser la indicada.

Los hidrolizados ácidos fueron llevados a cabo en vasos de vidrio refractarios con una capacidad de almacenar hasta 2 kg de bagazo, el tratamiento se realizó en una autoclave marca AESA modelo CV-250 a una presión de 1.2 psia durante 30 min, siendo estos independientes al tiempo en que la autoclave tarda en alcanzar la presión establecida (aproximadamente 25 min) y al tiempo en que se enfría (aproximadamente 15 min).

Al extraer el material hidrolizado de la autoclave, se realizó un prensado manual del material para extraer la mayor cantidad de líquido posible, la fracción líquida recuperada contiene glucosa y xilosa por lo que es un medio idóneo para desempeñar una fermentación seguido de una destilación.

Al residuo prensado se le aplicaron entre 3 a 5 lavados tomando en cuenta su RSL, la cual permite saber la cantidad de agua adecuada para llevar a cabo cada uno de ellos. Esto con el fin de que la muestra ácida alcance un pH neutro y permita que el pretratamiento alcalino se lleve a cabo de manera adecuada. Cada uno de los lavados se realizó en vasos de precipitado en el que se llevó a cabo agitación durante un tiempo aproximado de 3 min, al final de cada lavado, el residuo fue exprimido y vertido para el siguiente lavado hasta llegar al pH deseado.

La muestra sólida después de que alcanzó el pH neutro, se sometió a un proceso de secado durante 2 h aproximadamente, en una estufa de secado marca Lab-line Instrument Inc, modelo 3471 hasta que la muestra estuviera completamente seca; una vez ocurrido esto se procedió con el siguiente pretratamiento.

### **2.5.2 Pretratamiento alcalino**

La optimización de la hidrólisis alcalina de una mezcla de madera se llevó a cabo mediante un diseño experimental Box-Benhen de tres factores, siendo las variables independientes: tiempo (30, 50 y 70 h), concentración H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2, 4 y 6 % v/v) y RSL (10, 15 y 20 g:mL) presentadas en la Tabla 2.2, siendo la variable de respuesta la cantidad de lignina removida (%).



En esta etapa de hidrolisis alcalina de RM se preparó cada una de las corridas en frascos de 1 L cada una contenida con 5 g de muestra. La mezcla se agita para homogenizar y lograr un mejor contacto entre el residuo lignocelulósico y la fase líquida, dejando reposar durante 10 min para que todo el residuo lignocelulósico pueda humedecerse perfectamente. Transcurrido este tiempo, se procedió a ajustar el pH de la reacción a 11.5 con NaOH 10 M. Una vez que la mezcla alcanzó el pH óptimo, la reacción comienza y se deja reposar por el tiempo correspondiente indicado en el diseño con una agitación ocasional.

Tabla 2.2 Variables para llevar a cabo la optimización de la hidrólisis alcalina

Tiempo (h)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (% v/v)	RSL (g:mL)
30	2	10
50	4	15
70	6	20

Al finalizar el tiempo establecido, se retiró la fase sólida de la líquida, empleando mallas que faciliten el filtrado de la mezcla y no permitan la pérdida de materia. Pues al tratarse de cantidades pequeñas y del alto nivel de degradado del bagazo pudiera haber pérdidas al momento de retirar el excedente de líquido. Una vez obtenida toda la celulosa, se llevaron a cabo entre 3 a 5 lavados con agua corriente para tener un ajuste de pH de 7, la cantidad de agua necesaria para cada lavado corresponde a su RSL. Una vez que la muestra tiene un pH ajustado se expuso a un secado mediante una estufa marca: Lab-line Instrument Inc, modelo 3471 con la finalidad de eliminar la máxima cantidad de agua posible y dejar la muestra inferior al 10% para poder aplicar la técnica de NREL.

Como en casi todos los casos de hidrolisis alcalina al llevar a cabo el ajuste de pH con NaOH con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produce una reacción exotérmica, lo que incrementa el volumen hasta el doble del original, por esta razón el equipo destinado para este

proceso se debe de utilizar no mayor al 50 % de su capacidad manteniendo espacio libre para la espuma originada durante la estabilización de la reacción y evitar que al momento de la reacción se derrame y se pierda materia y por consiguiente tener que repetir la técnica.

## **2.6 Estudio del pretratamiento alcalino de maderas puras**

Se llevó a cabo un estudio en el cual se vieron involucradas los RM<sub>C</sub> y RM<sub>P</sub>, aplicando el pretratamiento alcalino. Para el análisis de estas muestras, ambos residuos fueron sometidos al pretratamiento ácido indicado en la sección 2.5.1, posteriormente se reprodujo el diseño experimental Box-Behnken en el que se obtuvo la optimización de los RM en la sección 2.5.2 para ambos tipos de madera, para lo cual se trabajaron muestras de 5 g cada una en recipientes de 1 L de capacidad para tener un mejor contacto entre la fase líquida y la muestra. Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis las muestras se analizaron mediante la prueba de NREL para conocer el porcentaje de lignina removido.

## **2.7 Evaluación de maderas puras reduciendo el tamaño de partícula.**

Para el análisis en la reducción del tamaño de partícula, los dos tipos de maderas puras fueron trituradas previamente utilizando una licuadora marca Molineux:, posteriormente se ocuparon dos diferentes tipos de tamices marca Standard Test Sieve, el No. 70 de 0.0083 in, S. 01369095 W.S. Tyler, y el No. 80 de 0.0091 in, S. 01395621 W.S. Tyler.

Al final del tamizado se obtuvieron tres lotes de los dos tipos de madera, dos de ellos del tamiz, y el tercero se ocupó la muestra que no logró pasar por la malla. Posteriormente se aplicó el pretratamiento ácido descrito en la sección 2.5.1, hidrolizando 100 g de cada lote antes obtenido.

Para llevar a cabo el pretratamiento alcalino se analizó de acuerdo a los resultados obtenidos del diseño experimental que se ocupó en la sección 2.6, utilizando muestras de 5 g cada una en recipientes de 1 L de capacidad. Por último, se aplicó

la técnica para conocer el porcentaje de lignina removido en la muestra NREL, para saber el efecto significativo que tuvo la reducción en el tamaño de partícula.

## **2.8 Análisis de la materia prima e hidrolizados por HPLC**

Las muestras líquidas una vez filtradas fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 10 min a 4°C y congeladas, para posteriormente ser analizadas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Antes de ser analizadas por HPLC las muestras fueron descongeladas y tratadas con una solución de BaO 0.3 M y de ZnSO<sub>4</sub> al 5 % p/v con la finalidad de eliminar impurezas presentes tales como proteínas y almidones entre otras que son capaces de taponar tanto los filtros como la precolumna y columna del HPLC. La relación utilizada fue 8:1:1, dejando reposar por 10 min después de una agitación vigorosa de los tubos eppendorf, pasando posteriormente a una centrifugación durante 10 min a 10,000 rpm.

Se determinó a partir de HPLC los valores del área bajo la curva para la glucosa, xilosa y arabinosa para su conversión a porcentaje para cada uno de los residuos e hidrolizados utilizando las regresiones lineales correspondientes a las ecuaciones 2.5, 2.6 y 2.7, para su posterior análisis por la técnica de NREL utilizando una columna ShodexSH1011, específica para la separación de azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes.

La fase móvil empleada fue H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05 N, Velocidad de flujo, 0.6 mL/min; Temperatura de la columna, 55°C; Tipo de detector: índice de refracción Marca Waters modelo 2414; Volumen de inyección, 10 µL y 20 min de duración de análisis por muestra. El software utilizado fue Empower (Waters), que reporta directamente la concentración de la muestra mediante una correlación con estándares previamente realizados (glucosa anhidra, grado alimenticio de Golden Bell Reactivos y fructosa grado reactivo de Baker, ambas en concentraciones de 100, 50, 16.6, 10, 5, 2.5, 1.66, 1.25, 1, 0.50 y 0.33 g/L; glicerol anhidro, grado reactivo, Baker en concentraciones de 10, 5, 1.66, 1, 0.5, 0.25, 0.16, 0.12, 0.10, 0.05 y 0.03 g/L ; ácido acético glacial, grado reactivo, Baker en concentraciones de 30, 15, 5, 3,

1.5, 0.75, 0.5, 0.37, 0.3, 0.15 y 0.1 g/L, y alcohol etílico absoluto anhidro, grado reactivo, Baker en concentraciones de 10, 5, 1.66, 1, 0.5, 0.25, 0.16, 0.12, 0.10, 0.05 y 0.03 g/L)

### 2.8.1 Análisis de datos a partir de HPLC para NREL

Los datos obtenidos al llevar a cabo el análisis por el HPLC deben ser sometidos a diversas ecuaciones para poder obtener los resultados deseados. En la Tabla 2.3 se muestran las ecuaciones pertinentes para celulosa que son de la 2.1 a 2.4 y hemicelulosa de 2.5 a 2.9.

Tabla 2.3 Ecuaciones para concentraciones de celulosa y hemicelulosa.

Celulosa	$Conc. glucosa = Conc. glucosa HPLC * dilución$	(2.1)
	$\%Glucanos = \left( \frac{masa glucosa * 100}{ODW} \right)$	(2.2)
	$\%Celulosa = \left( \frac{\%Glucanos * 100}{90} \right)$	(2.3)
	$masa glucosa = \left( \frac{conc. glucosa * 87}{1000} \right)$	(2.4)
Hemicelulosa	$\%Hemicelulosa = \left( \frac{\%xilosa * 100}{70} \right)$	(2.5)
	$\%xilano = \left( \frac{masa corregida * 100}{ODW} \right)$	(2.6)
	$masa corregida = masa xilosa * 0.88$	(2.7)
	$masa xilosa = \left( \frac{concentración * 87}{1000} \right)$	(2.8)
	$Conc. = Conc. xilosa HPLC * dilución$	(2.9)

Para poder determinar los valores de lignina del material lignocelulósico se debe llevar a cabo el análisis de los resultados en las ecuaciones 2.10 a 2.13 mostradas a continuación:

$$ODW = \left( \frac{\% \text{ total de sólidos} * \text{peso de la muestra}}{100} \right) \quad (2.10)$$

$$\%AIR = \left( \frac{\text{peso de crisol con AIR} * \text{peso del crisol}}{ODW} \right) \quad (2.11)$$

$$\%AIL = \frac{(\text{Peso de crisol con AIR} - \text{Peso de crisol}) - (\text{Peso de crisol con cenizas} - \text{peso de crisol})}{ODW0} * 100 \quad (2.12)$$

$$\%ASL = \left( \frac{(\text{absorbancia} * 0.08673 * \text{dilución}) - \text{peso de crisol}}{(25 * ODW * \text{longitud de celda})} \right) \quad (2.13)$$

En donde: ODW es el peso seco de la muestra (g), AIR es el residuo insoluble en ácido (%), AIL es lignina insoluble en ácido (%), ASL la lignina soluble en ácido (%), determinando la absorbancia de la muestra (nm), dilución (mL), peso de crisol, peso de cenizas y peso de la muestra (g).

## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Caracterización lignocelulósica

La caracterización del material lignocelulósico que se empleó durante el desarrollo de esta experimentación se presenta en la Tabla 3.1, en la cual se tomaron muestras por triplicado del lote inicial de la materia prima de los residuos de madera (RM) y las maderas puras (**RM<sub>C</sub>** y **RM<sub>P</sub>**).

Tabla 3.1. Caracterización inicial del material lignocelulósico

<b>Componente</b>	<b>RM</b>	<b>RM<sub>C</sub></b>	<b>RM<sub>P</sub></b>
Celulosa (%)	56.17	50.01	44.35
Hemicelulosa (%)	23.33	26.59	29.13
Lignina (%)	13.79	14.88	14.19
Humedad (%)	12.37	11.41	10.34

De acuerdo con los resultados obtenidos y en comparación a los reportados por Navarro (2012) en lo que respecta a la composición lignocelulósica, se puede observar un incremento del 15.74 % al contenido reportado, mientras que la hemicelulosa presente, el porcentaje disminuye su valor en un 8.36%. El porcentaje de lignina, es evidente que resulta menor al presentarse un valor del 13.79 %, teniendo una reducción del 38.41 % en comparación a lo reportado lo cual favorecerá al proceso que se va a efectuar al tener un menor porcentaje de este componente.

### 3.2 Hidrólisis alcalina de RM

El proceso de optimización de Hidrólisis alcalina sobre el material lignocelulósico (RM), se realizó mediante un diseño de experimentos Box-Behnken de tres variables, las cuales fueron tiempo ( $x_1$ ), concentración de  $H_2O_2$  ( $x_2$ ) y RSL ( $x_3$ ), mostrando los resultados obtenidos en la Tabla 3.2. Para llevar a cabo el análisis estadístico se utilizó el software Minitab Inc. 2017, siendo la variable de respuesta el porcentaje en el contenido de lignina.

Tabla 3.2. Diseño Box-Behnken para el proceso de hidrólisis alcalina de RM, etapa 1

NO.	(X <sub>1</sub> ) tiempo [h]	(X <sub>2</sub> ) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [%v/v]	(X <sub>3</sub> ) RSL [g:mL]	% Lignina
1	30	2	15	13.2719
2	70	2	15	13.3787
3	30	6	15	13.5527
4	70	6	15	13.8598
5	30	4	10	13.968
6	70	4	10	12.4289
7	30	4	20	13.5297
8	70	4	20	13.5449
9	50	2	10	15.0968
10	50	6	10	14.1016
11	50	2	20	14.2979
12	50	6	20	14.824
13	50	4	15	13.6778
14	50	4	15	14.473
15	50	4	15	12.0332

El análisis estadístico se realizó mediante el software Minitab Inc. 2017, siendo la variable de respuesta el porcentaje de lignina removido, en el cual se generó el ANOVA y el gráfico de residuos correspondiente se presenta en el Anexo C. El modelo que se obtuvo durante el análisis de la experimentación de hidrólisis alcalina está descrito en la Ecuación 3.1 alcanzándose un ajuste ( $R^2$ ) del 42.16 %, lo cual al ser un valor muy bajo, no garantiza la reproducibilidad de las correlaciones experimentales para lograr las mejores condiciones para este proceso con los valores establecidos en el diseño.

$$\begin{aligned} \%Lignina_{RM} = & 22.82 + 0.066x_1 - 1.95x_2 - 0.954x_3 - 0.00136x_1^2 + 0.167x_2^2 \\ & + 0.0208x_3^2 + 0.0013x_1x_2 + 0.00389x_1x_3 + 0.0380x_2x_3 \quad (3.1) \end{aligned}$$



En la Figura 3.1 se presentan las gráficas de superficie de respuesta, a partir de las cuales se estima un tiempo de operación en un rango aproximado de 40 a 50 h, una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 5 % v/v y una RSL elevada de 16 g:mL, teniendo una remoción promedio de 12.0332%, esto se debe a que al llevar a cabo la experimentación, la mezcla de maderas resultó ser un material muy absorbente.

Estos valores aproximados se comprobaron mediante un análisis canónico, procediendo a encontrar los puntos estacionarios mostrados en la ecuación (3.2), generándose a partir del modelo presentado en la ecuación (3.1), resultando: un tiempo de 47.4366 h, una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 3.9609 % y una RSL de 14.8788 g:mL.

$$X_s = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 0.066 \\ -1.95 \\ -0.954 \end{pmatrix} * \begin{pmatrix} -0.0014 & 0.0006 & 0.0019 \\ 0.0006 & 0.1670 & 0.0190 \\ 0.0019 & 0.0190 & 0.0208 \end{pmatrix}^{-1} = \begin{pmatrix} 47.4366 \\ 3.9609 \\ 14.8788 \end{pmatrix} \quad (3.2)$$

De acuerdo a lo obtenido en el análisis del primer diseño experimental, se determinó establecer un nuevo diseño de experimentos Box-Behnken de tres variables, las cuales fueron tiempo ( $x_1$ ) utilizando rangos de [20, 35 y 50 h], concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $x_2$ ) con rango de [2, 5 y 8 % v/v] y RSL ( $x_3$ ) con rangos de [10, 15 y 20 g:mL]. La Tabla 3.3 muestra la estructura completa del diseño tomando en cuenta las variables involucradas con los respectivos resultados obtenidos durante la experimentación.

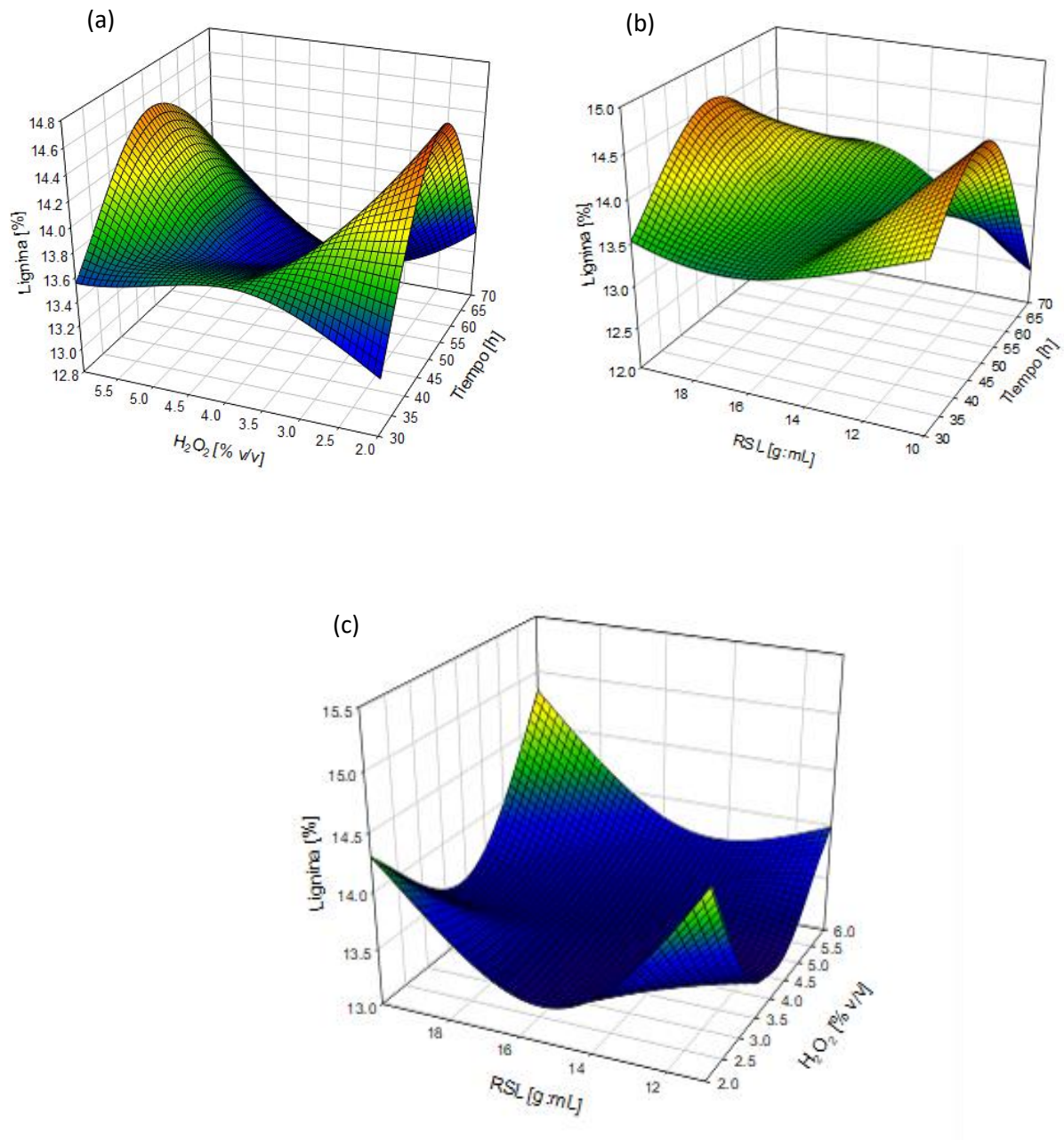


Figura 3.1 Gráficos de superficie de respuesta del proceso de hidrólisis alcalina sobre RM etapa 1; a) Tiempo [h] vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [%v/v]; b) Tiempo [h] vs RSL [g:mL]; c) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [%v/v] vs RSL [g:mL].

Se realizó el análisis estadístico siendo la variable de respuesta el porcentaje de lignina removido, su ANOVA y la gráfica de residuos se presenta en el Anexo D. El

modelo obtenido durante el análisis de la experimentación de hidrólisis alcalina está descrito en la Ecuación 3.3 con un ajuste ( $R^2$ ) del 72.86 %.

**Tabla 3.3.** Diseño Box-Behnken para la etapa de hidrólisis alcalina para RM, etapa 2

NO.	(X <sub>1</sub> ) tiempo [h]	(X <sub>2</sub> ) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [%v/v]	(X <sub>3</sub> ) RSL [g:mL]	% Lignina
1	20	2	15	13.21
2	50	2	15	12.55
3	20	8	15	12.85
4	50	8	15	11.78
5	20	5	10	13.41
6	50	5	10	14.04
7	20	5	20	12.2
8	50	5	20	12.26
9	35	2	10	13.1
10	35	8	10	12.04
11	35	2	20	12.37
12	35	8	20	11.83
13	35	5	15	11.11
14	35	5	15	12.14
15	35	5	15	12.25

$$\begin{aligned} \%Lignina_{RM} = & 21.40 - 0.188x_1 - 0.232x_2 - 0.604x_3 - 0.00313x_1^2 + 0.0068x_2^2 \\ & + 0.0176x_3^2 + 0.00228x_1x_2 + 0.00190x_1x_3 + 0.0087x_2x_3 \quad (3.3) \end{aligned}$$

Las nuevas condiciones propuestas, aún no garantizan la reproducción de las correlaciones experimentales para obtener las mejores condiciones para este proceso con los valores establecidos en el diseño. En la Figura 3.2, se observan las gráficas de superficie de respuesta, en las cuales se aprecia que para éste diseño se necesitaría llevar a cabo la experimentación en un rango de tiempo de 35-40 h, una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aproximada de 8% y una RSL de 16 g:mL obteniendo

una remoción promedio de 11.11 %. La RSL sigue siendo elevada de acuerdo al material que se está utilizando.

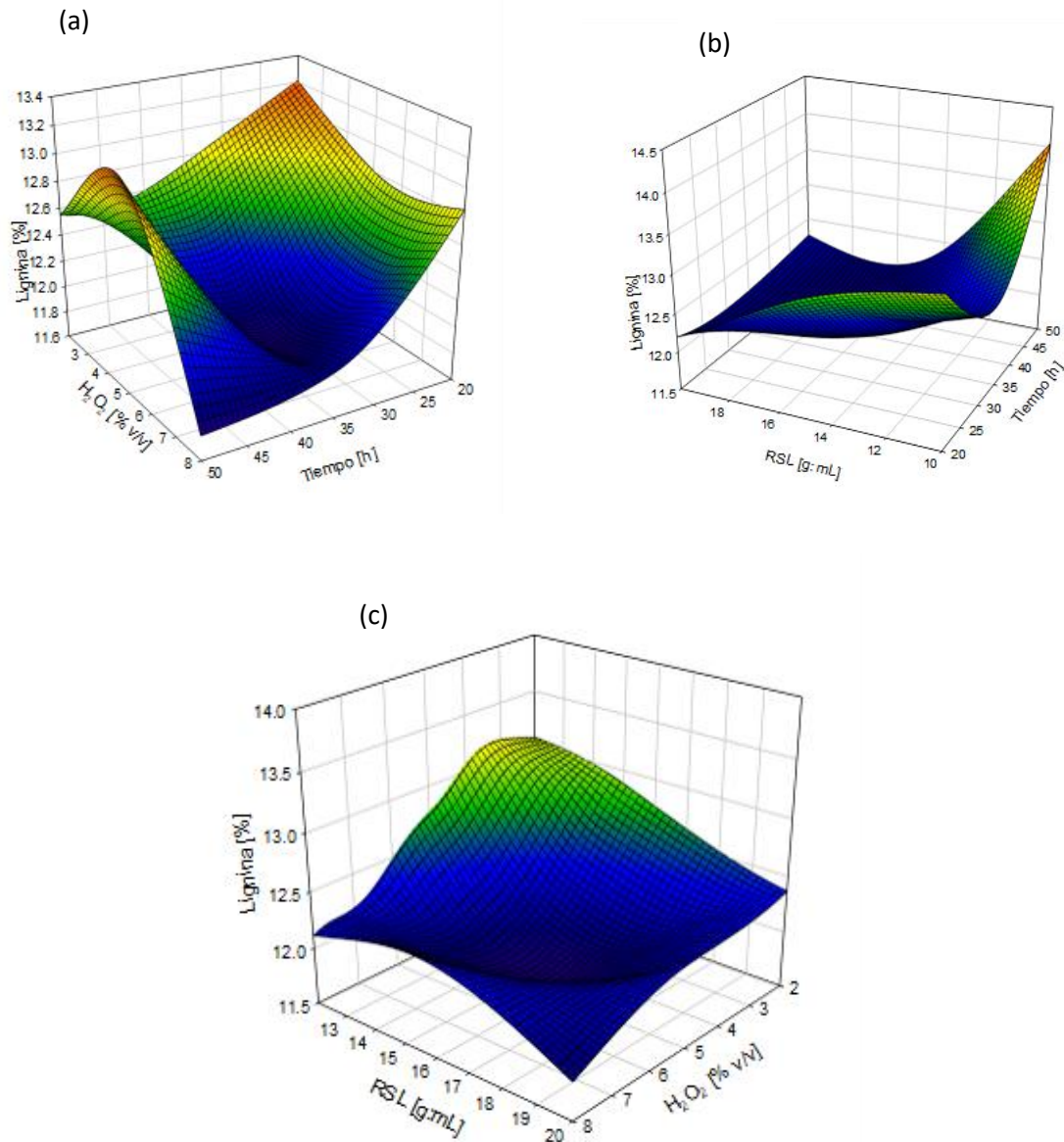


Figura 3.2 Gráficos de superficie de respuesta del proceso de hidrólisis alcalina sobre RM etapa 2 ; a) Tiempo [h] vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [%v/v]; b) Tiempo [h] vs RSL [g:mL]; c) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [%v/v] vs RSL [g:mL]

Se procedió a realizar el análisis canónico a partir del modelo generado para este diseño (Ec. 3.3), obteniendo los puntos estacionarios mostrados en la Ecuación

3.4, determinándose que dichos puntos fueron: tiempo de 39.8013 h, concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 13.5176 % y RSL de 15.9665 g: mL

$$X_s = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} -0.188 \\ -0.232 \\ -0.604 \end{pmatrix} * \begin{pmatrix} 0.00313 & -0.00114 & -0.00095 \\ -0.00114 & 0.0068 & 0.00435 \\ -0.00095 & 0.00435 & 0.0176 \end{pmatrix}^{-1} = \begin{pmatrix} 39.8013 \\ 13.5176 \\ 15.9665 \end{pmatrix} \quad (3.4)$$

El análisis de los valores propios ( $\lambda_1 = -0.028$ ,  $\lambda_2 = 0.0055$  y  $\lambda_3 = 0.0192$ ), demuestran la existencia un punto de silla, por lo cual no se logra la minimización correspondiente al encontrarse con valores con diferente signo.

No obstante, este estudio sirvió como antecedente para poder establecer un nuevo diseño experimental que permita determinar la optimización del proceso de hidrólisis alcalina, por lo cual, se establece un nuevo diseño de experimentos Box-Behnken de tres variables, siendo estas tiempo ( $X_1$ ) en un rango de [27, 38.5 y 50 h], concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $X_2$ ) con rangos de [6, 8 y 10 % v/v] y una RSL ( $X_3$ ) en rangos de [12, 16 y 20 g: mL]. La estructura completa del diseño propuesto se muestra en la Tabla 3.5 con las variables que intervienen, siendo la variable de respuesta el % de lignina removida.

### 3.3 Optimización del proceso de hidrólisis alcalina de RM

Se realizó el análisis estadístico del diseño, utilizando el software Minitab Inc. 2017 generándose un modelo de segundo orden (Ec. 3.5), el cual presentó un ajuste de 98.89% que representa la confiabilidad en la reproducción de las correlaciones experimentales con los valores establecidos en el diseño para obtener la optimización de este proceso

Tabla 3.4 Estructura del diseño Box Behnken para la optimización del proceso de hidrólisis alcalina de RM. ( $\sigma = 2.16$ )

NO.	(X <sub>1</sub> ) Tiempo [h]	(X <sub>2</sub> ) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%v/v)	(X <sub>3</sub> ) RSL [g: mL]	%Lignina
1	27	6	16	13.2719 ± 0.0289
2	50	6	16	13.3787 ± 0.0066
3	27	10	16	13.5527 ± 0.0647
4	50	10	16	13.8596 ± 0.0294
5	27	8	12	13.968 ± 0.0107
6	50	8	12	12.4289 ± 0.0263
7	50	8	20	13.5297 ± 0.0255
8	50	8	20	13.5449 ± 0.0108
9	38.5	6	12	15.0968 ± 0.0167
10	38.5	10	12	14.1016 ± 0.0042
11	38.5	6	20	14.2979 ± 0.0041
12	38.5	10	20	14.824 ± 0.0164
13	38.5	8	16	8.8233 ± 3.77 <sup>-06</sup>
14	38.5	8	16	8.8465 ± 0.0026
15	38.5	8	16	8.8002 ± 0.0026

$$\begin{aligned} \%Lignina_{RM} = & 132.1 - 1.178X_1 - 12.635X_2 - 6.296X_3 + 0.01316X_1^2 + 0.7381X_2^2 \\ & + 0.1753X_3^2 + 0.00217X_1X_2 + 0.00845X_1X_3 + 0.0475X_2X_3 \end{aligned} \quad (3.5)$$

Mediante la metodología de superficie de respuesta se procedió a analizar los gráficos generados en este diseño que se muestran en la Figura 3.5. Se observa que para la minimización del porcentaje de lignina se requieren niveles altos de RSL (1:16), y de concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (8%), en tanto que el tiempo requiere valores medios (35 - 40 h), obteniéndose un contenido de lignina de 8.8233%. Esto se debe a que durante la experimentación del proceso de hidrólisis se notó que la materia

prima tiene como característica principal ser muy absorbente, por ello los valores elevados en cada factor.

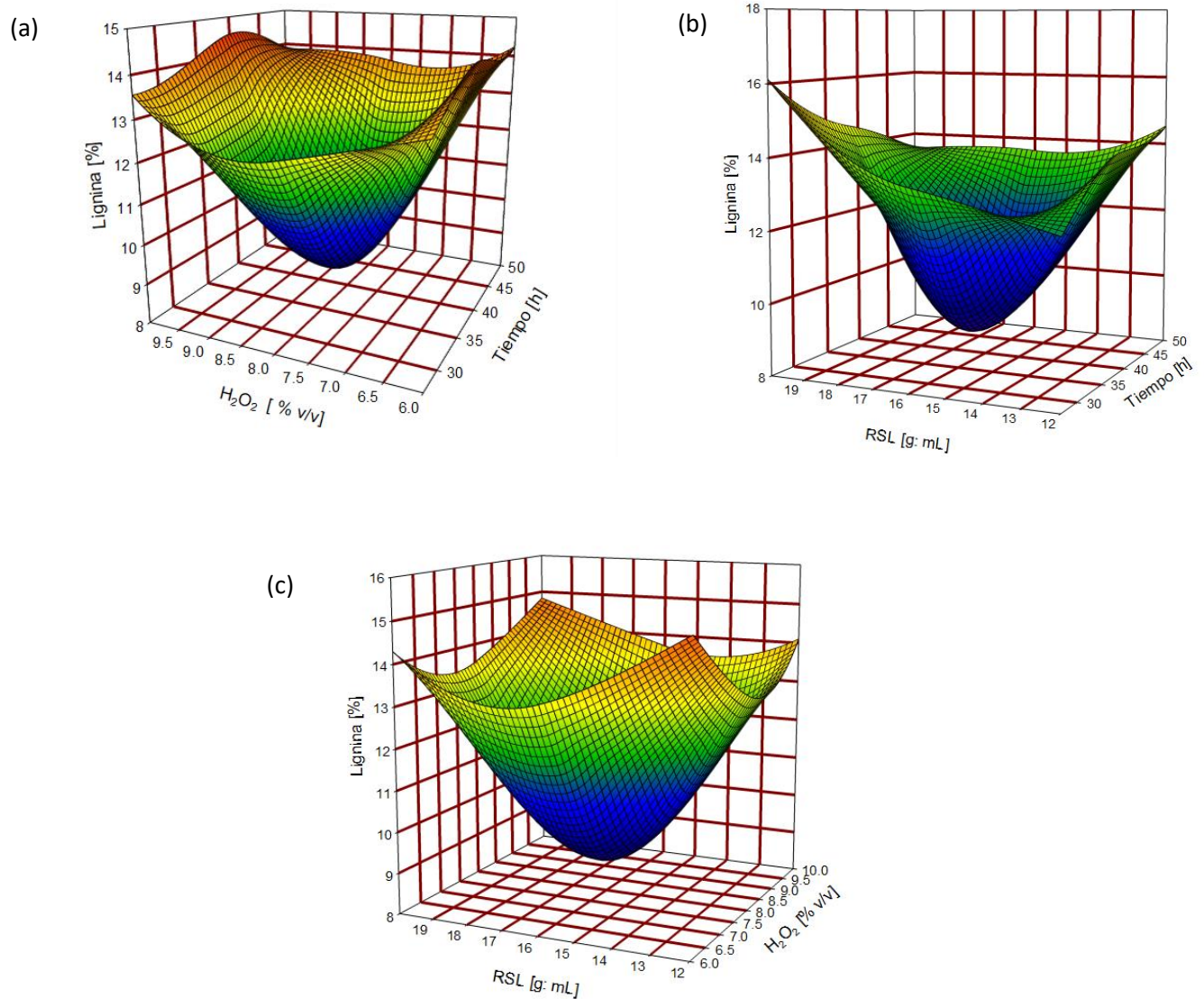


Figura 3.3 Gráficos de superficie de respuesta del proceso de hidrólisis alcalina sobre RM para la optimización; a) Tiempo [h] vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [%v/v]; b) Tiempo [h] vs RSL [g:mL]; c) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [%v/v] vs RSL [g:mL]

Mediante los gráficos de contornos (Figura 3.6), se establecen las regiones óptimas, definiendo que los rangos se encuentran definidos como: tiempo entre 36 - 42 h, concentración de  $H_2O_2$  entre 7.5 - 8.5 % y RSL de 15 - 17 g : mL.

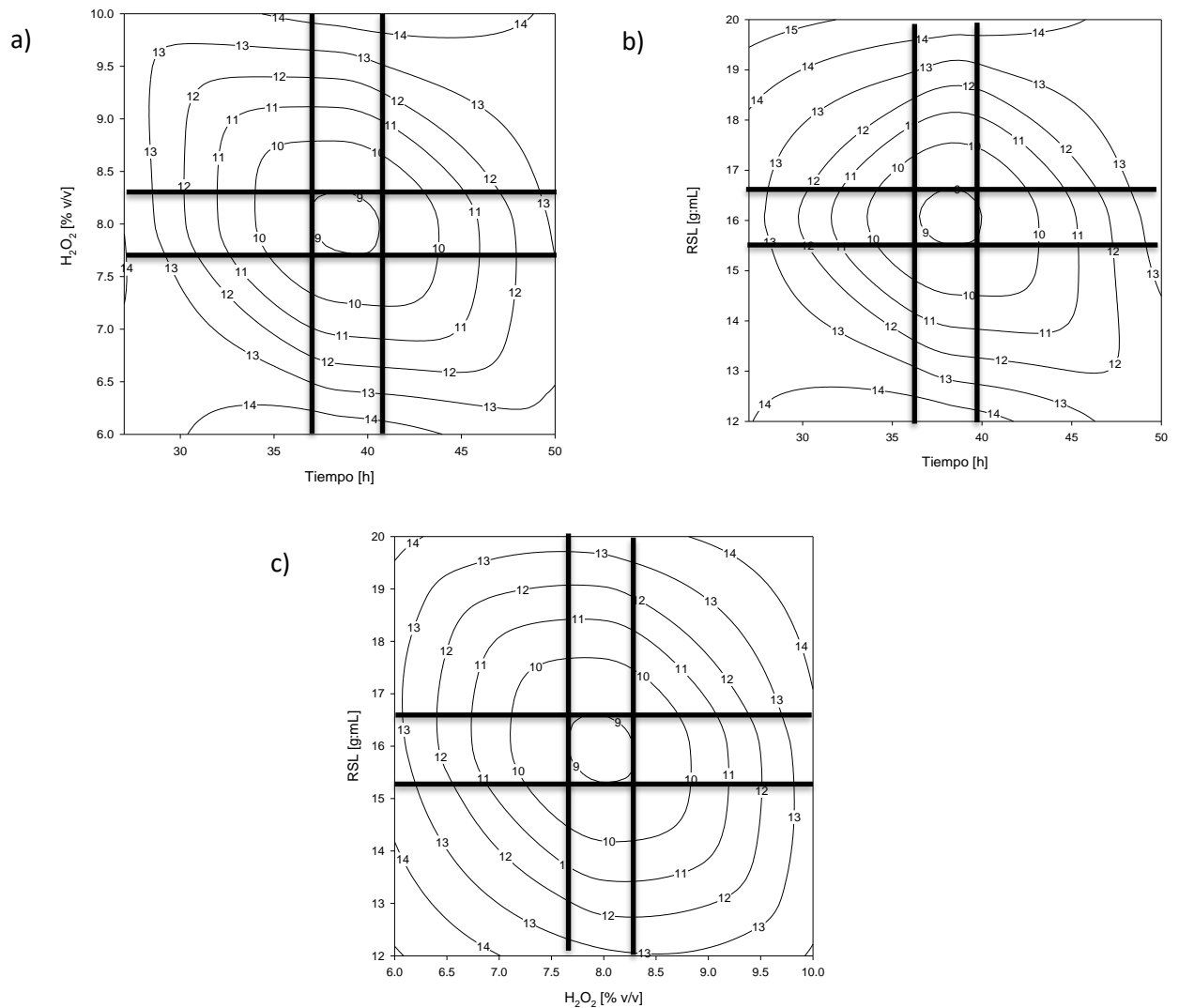


Figura 3.4 Gráficos de contornos del proceso de hidrólisis alcalina sobre RM para la optimización: a) tiempo [h] vs  $H_2O_2$  [%v/v] ; b) tiempo [h] vs RSL [g:mL]; c)  $H_2O_2$  [% v/v] vs RSL [g:mL].

Se llevó a cabo un análisis canónico para determinar la optimización del proceso de hidrólisis alcalina a partir del polinomio de segundo orden mostrado en la ecuación 3.6. Los puntos estacionarios se muestran en la ecuación 3.7, en los que se puede



observar que se requiere un tiempo de 38.9287 h, una RSL de 16.1032 g:mL y una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 7.9838 % obteniendo un porcentaje de lignina de 8.8002%.

$$X_s = -\frac{1}{2} \begin{pmatrix} 0.01316 & 0.00185 & 0.004225 \\ 0.001085 & 0.7381 & 0.02375 \\ 0.004225 & 0.02375 & 0.1753 \end{pmatrix}^{-1} * \begin{pmatrix} -1.178 \\ -12.635 \\ -6.296 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 38.9287 \\ 7.9838 \\ 16.1032 \end{pmatrix} \quad (3.7)$$

Una vez obtenidos los puntos estacionarios, es necesario establecer si éstos generan una respuesta mínima. Para ello se obtuvieron los valores propios, y se generó el modelo canónico (Ec. 3.8), los tres valores propios presentan signo positivo, lo que garantiza que el punto estacionario corresponde a un mínimo

$$y = 132.1 + 0.0130w_1^2 + 0.1726w_2^2 + 0.7391w_3^2 \quad (3.8)$$

De acuerdo con el análisis resultado de este proceso, donde se emplearon RM se alcanzó una remoción de lignina de 42.55 %, Jaramillo *et al.*, (2017), aplicando ácido sulfúrico, posterior de una hidrólisis alcalina con hidróxido de sodio donde obtuvieron una remoción de lignina de 46.7%, teniendo una remoción de 8.99 % superior al de este trabajo, Ellinor (2016), evaluaron el pretratamiento alcalino utilizando NaOH h y una combinación de NaOH agregando urea utilizando aserrín no controlado de maderas, obtuvieron solamente una remoción de lignina de 2.6 y 2.5 % respectivamente, que en comparación con este trabajo trabajando con el pretratamiento alcalino descartando trabajar con urea existe un 93.88 mayor de remoción de lignina

### 3.4 Proceso de hidrólisis alcalina utilizando maderas puras (RM<sub>C</sub> y RM<sub>P</sub>)

Para este estudio, se empleó diseño Box-Behnken de tres variables establecido en la optimización del proceso definido en la Tabla 3.4 para RM, y cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5 Estructura del diseño Box Behnken para la optimización del proceso de hidrólisis alcalina utilizando  $RM_C$  ( $\sigma = 2.33$ ) y  $RM_P$  ( $\sigma = 2.15$ )

NO.	( $X_1$ ) tiempo [h]	( $X_2$ ) $H_2O_2$ (%v/v)	( $X_3$ ) RSL [g: mL]	% Lignina $RM_C$	% Lignina $RM_P$
1	27	6	16	13.0047 ± 0.0275	13.6801 ± 0.0041
2	50	6	16	13.5884 ± 0.0508	14.8119 ± 0.0282
3	27	10	16	13.6963 ± 0.0560	13.7107 ± 0.0288
4	50	10	16	13.3766 ± 0.0283	13.1942 ± 0.0043
5	27	8	12	13.6039 ± 0.0254	14.8720 ± 0.0229
6	50	8	12	14.9580 ± 0.0002	14.6682 ± 0.0454
7	50	8	20	13.6791 ± 0.0002	13.3378 ± 0.0553
8	50	8	20	14.0232 ± 0.0259	12.7569 ± 0.0281
9	38.5	6	12	12.4447 ± 0.0617	13.4451 ± 0.0222
10	38.5	10	12	14.0139 ± 0.0259	13.6754 ± 0.0585
11	38.5	6	20	14.8347 ± 0.0257	9.7214 ± 0.0721
12	38.5	10	20	9.3592 ± 0.0717	9.7605 ± 0.0290
13	38.5	8	16	9.0545 ± 0.0433	9.6610 ± 0.0212
14	38.5	8	16	8.9593 ± 0.0323	9.0711 ± 0.0410
15	38.5	8	16	8.0207 ± 0.0757	9.6465 ± 0.0197

### 3.4.1 Estudio de la reducción de lignina en $RM_C$

A partir del análisis estadístico de la remoción de lignina de  $RM_C$  utilizando el software Minitab Inc, 2017, se generó el modelo de la experimentación de hidrólisis alcalina mostrado en la ecuación 3.9, con un ajuste de 95.35% que representa la confiabilidad en la reproducción de las correlaciones experimentales con los valores establecidos en el diseño para obtener la optimización de este proceso.

$$\begin{aligned} \%Lignina_{RM_C} = & 74.7 - 1.600X_1 - 2.98X_2 - 2.76X_3 + 0.02322X_1^2 + 0.417X_2^2 + 0.1448X_3^2 \\ & - 0.0098X_1X_2 - 0.00549X_1X_3 - 0.2201X_2X_3 \end{aligned} \quad (3.9)$$

Empleando la MSR, se generaron los gráficos de superficie (Figura 3.5), observándose que para la minimización del porcentaje de lignina se requiere RSL altas (1:16), así también la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es niveles altos, de aproximadamente de 8.5%, en lo que refiere al tiempo del proceso, se observa que para la minimización se encuentra entre un rango de 38 a 45 h con un contenido de lignina de 8.0207%.

Mediante el polinomio de segundo orden mostrado en la ecuación 3.9 se llevó a cabo el análisis canónico para evaluar el proceso de hidrólisis alcalina de RMc como materia prima para la obtención de los puntos estacionarios.

Los puntos estacionarios se muestran en la ecuación 3.10 que representan la minimización, en los que se puede observar que se requiere un tiempo de 38.1976 h, una RSL de 16.6510 g:mL y una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 8.4163 % obteniendo un porcentaje de lignina de 8.0207%

$$X_s = -\frac{1}{2} \begin{pmatrix} 0.02322 & -0.0049 & -0.002745 \\ -0.0049 & 0.417 & -0.11005 \\ -0.002745 & -0.11005 & 0.1448 \end{pmatrix}^{-1} * \begin{pmatrix} -1.600 \\ -2.98 \\ -2.76 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 38.1976 \\ 8.4163 \\ 16.6510 \end{pmatrix} \quad (3.10)$$

Para demostrar la minimización del proceso, se determinaron los eigenvalores a partir del polinomio de regresión de segundo orden denotado en la Ec. 3.9, los cuales, están representados en el modelo canónico en la Ecuación 3.13, cuyos valores positivos corroboran la minimización en el proceso.

$$y = 74.7 + 0.0230w_1^2 + 0.1061w_2^2 + 0.4560w_3^2 \quad (3.13)$$

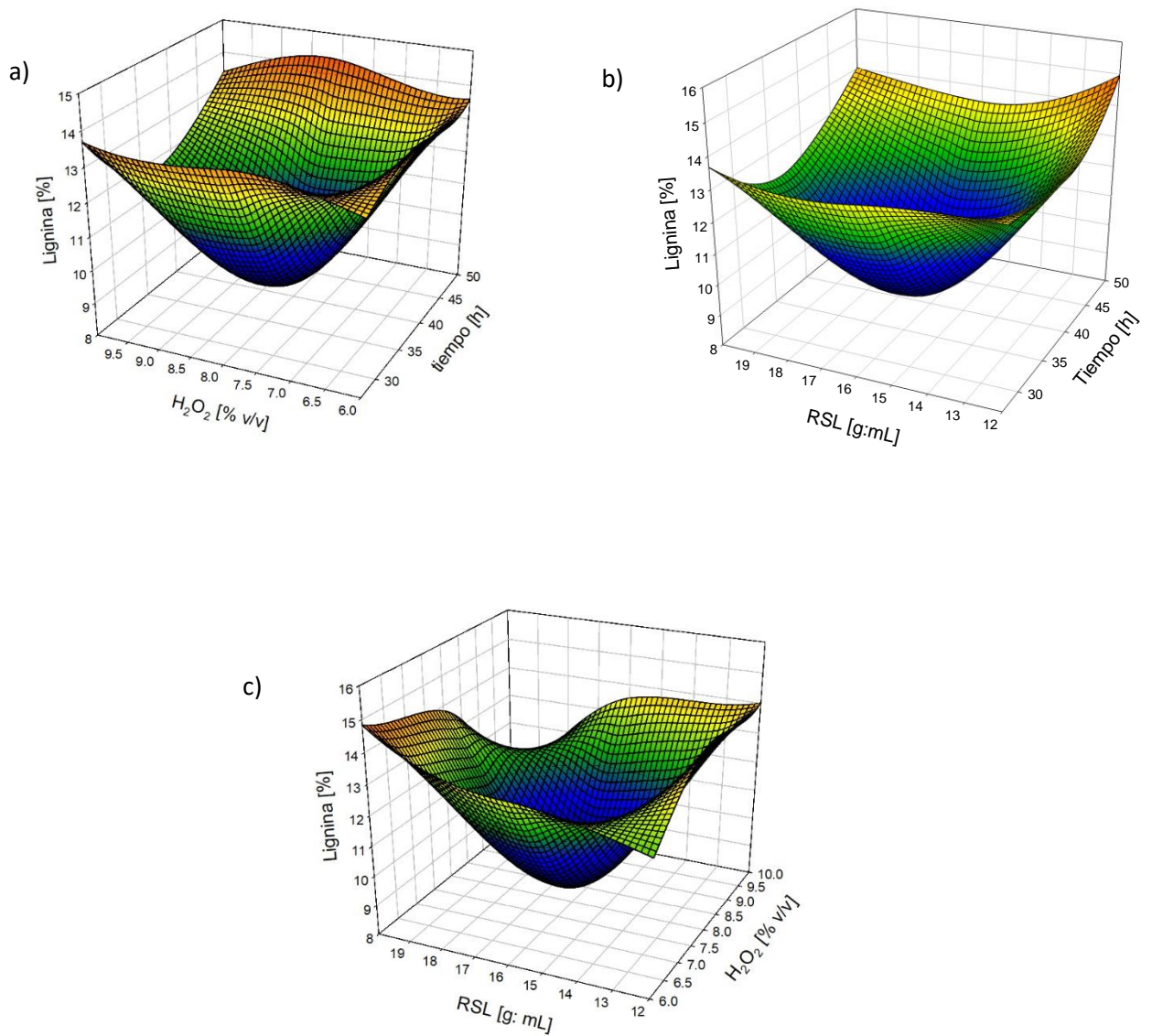


Figura 3.5 Gráficos de superficie de respuesta del proceso de hidrólisis alcalina sobre RMc; a) Tiempo [h] vs  $H_2O_2$  [%v/v]; b) Tiempo [h] vs RSL [g:mL]; c)  $H_2O_2$  [%v/v] vs RSL [g:mL].

En la Figura 3.6 se observan las gráficas de contorno en las cuales se ven más claramente los puntos estacionarios encontrados en la ec. 3.11, observando que el rango de tiempo está entre 36 y 42 h, una concentración de 7.5 y 8.5 % y RSL de 15 y 18 g: mL.

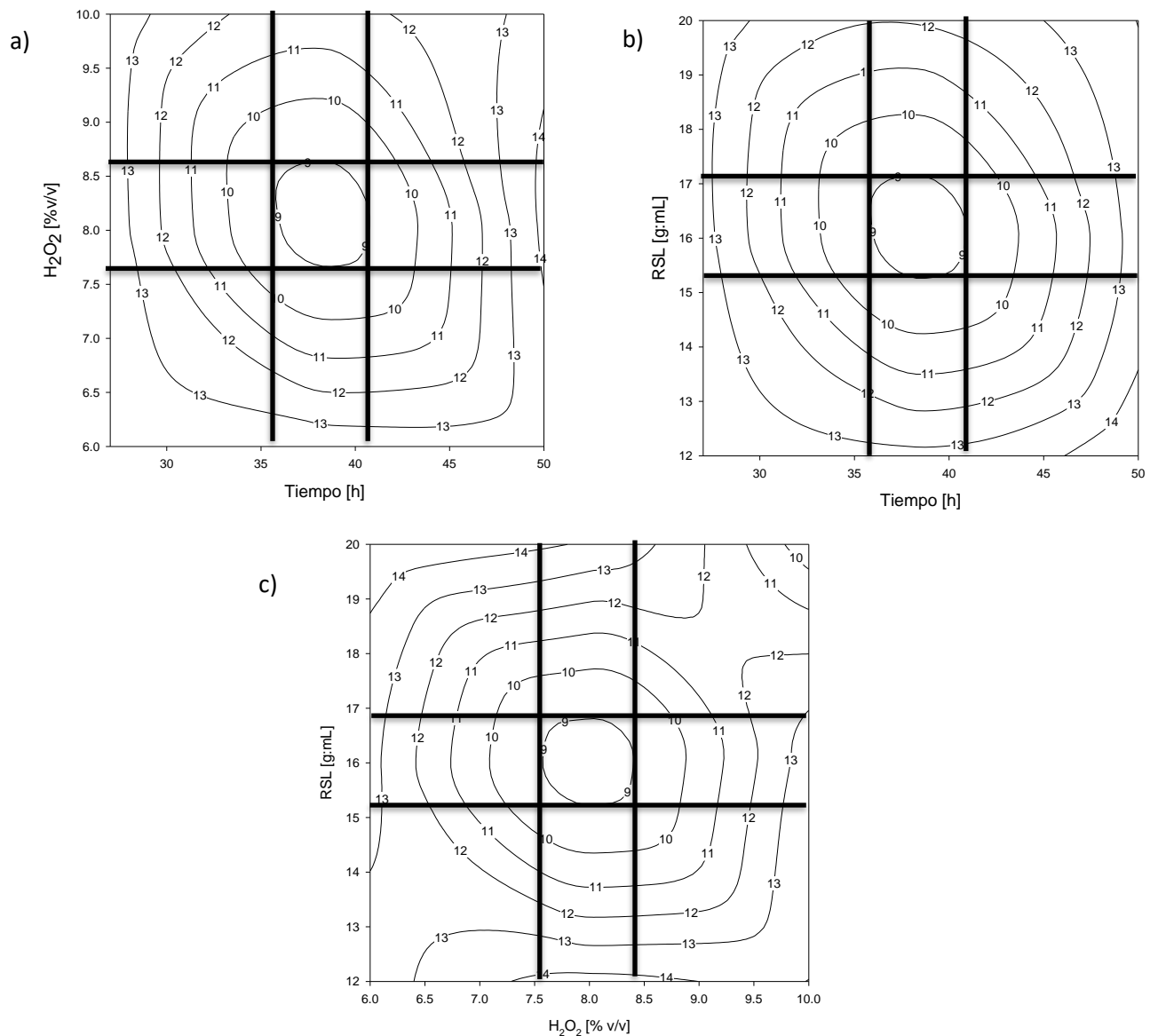


Figura 3.6 Gráficos de contornos del proceso de hidrólisis alcalina sobre  $RM_C$ ; a) Tiempo [h] vs  $H_2O_2$  [%v/v]; b) Tiempo [h] vs RSL [g:mL]; c)  $H_2O_2$  [%v/v] vs RSL [g:mL].

Kawakubo (2010) estudiaron la sacarificación enzimática de materiales lignocelulósicos, donde el acceso de las enzimas a las superficies de celulosa expuestas es un paso clave desarrollando los pretratamientos como la hidrólisis. Resultando al final de dos pretratamientos con diferente porcentaje de NaOH, de 3 y 5 % un contenido de lignina de 23.7 y 12.1 %, que en comparación al contenido de lignina presentado en este estudio que fue de 8.0207, resulta un 66.15 % mayor de remoción que el trabajando con 3 % de NaOH y un 33.71 % con respecto al de mayor concentración de reactivo, teniendo una remoción de lignina final de 46.0865%.

El comportamiento que tuvo el utilizar un sólo tipo de madera como lo fue el cedro, tuvo una aceptación en las condiciones del proceso que se obtuvieron de RM descritos en la sección 3.3, ya que los resultados fueron un poco similares, donde se puede apreciar que la cantidad de lignina final fue de 8.0207% mientras que en los RM fue de 8.8002 %, el cual existe un 9.71 % en el valor final de lignina obteniendo un porcentaje de 46.0865 % final de remoción lo cual resulta un 7.78 % mayor de remoción en cuanto a los RM, que tiene un 42.5 % de remoción.

### 3.4.2 Estudio de la reducción de lignina en RM<sub>P</sub>

Los resultados obtenidos al aplicar el diseño Box-Behnken a los RM<sub>P</sub> (Tabla 3.5), fueron analizados estadísticamente, empleando el software Minitab Inc, 2017, siendo la variable de respuesta el porcentaje de lignina removido, generándose un modelo de segundo orden de la hidrólisis alcalina el cual se muestra en la ecuación 3.14, presentando un ajuste de 95.24% que representa la confiabilidad en la reproducción de las correlaciones experimentales con los valores establecidos en el diseño para obtener la optimización utilizando este tipo de madera.

$$\begin{aligned} \%Lignin_{RM_P} = & 80.5 - 1.761X_1 - 3.56X_2 - 2.470X_3 + 0.02513X_1^2 + 0.266X_2^2 + 0.0703X_3^2 \\ & - 0.0179X_1X_2 - 0.00205X_1X_3 - 0.0060X_2X_3 \end{aligned} \quad (3.14)$$

A partir de la MSR, se analizaron los gráficos generados los cuales se muestran en la Figura 3.7.

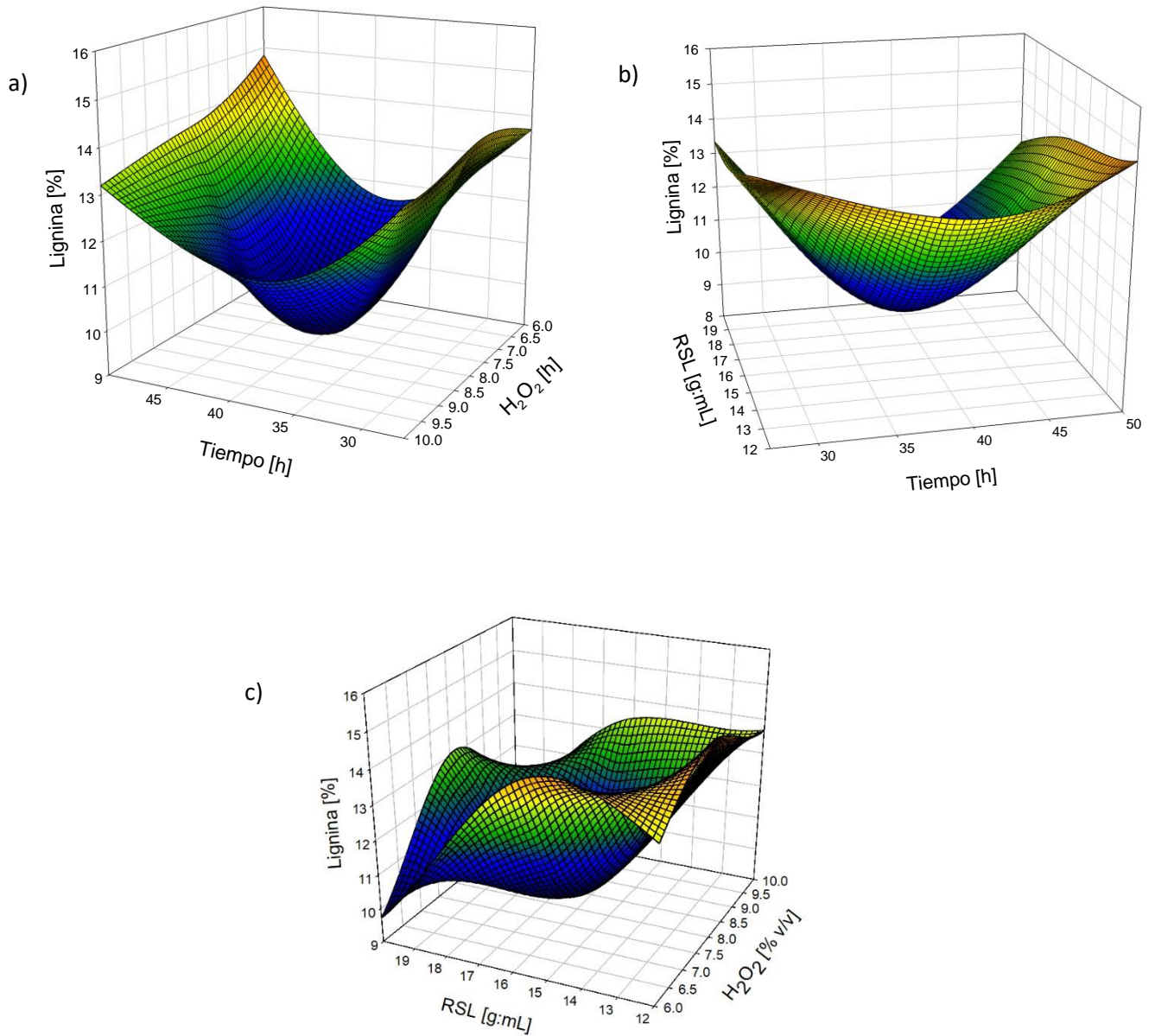


Figura 3.7 Gráficos de superficie de respuesta del proceso de hidrólisis alcalina sobre RMP; a) Tiempo [h] vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [%v/v]; b) Tiempo [h] vs RSL [g:mL]; c) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [%v/v] vs RSL [g:mL].

Se aprecia que para la minimización del porcentaje de lignina se requieren RSL a niveles altos (1:18), al igual que la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (8%), y para tiempo del proceso, se observa que la minimización se encuentra en valores medios (36 a 45 h) con un contenido de lignina de 9.0711%.

Mediante el polinomio de segundo orden mostrado en la ecuación 3.14 se llevó a cabo el análisis canónico para evaluar el proceso de hidrólisis alcalina de RM<sub>P</sub> como materia prima para la obtención de los puntos estacionarios (Ec. 3.15), en los cuales se obtuvo: tiempo de 38.7130 h, concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 8.2027 % y RSL de 18.4821 g:mL.

$$X_s = -\frac{1}{2} \begin{pmatrix} 0.02513 & -0.00895 & -0.001025 \\ -0.00895 & 0.266 & -0.003 \\ -0.001025 & -0.003 & 0.0703 \end{pmatrix}^{-1} * \begin{pmatrix} -1.761 \\ -3.56 \\ -1.761 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 38.7130 \\ 8.2027 \\ 18.4821 \end{pmatrix} \quad (3.15)$$

En la ecuación 3.17 se presenta la forma canónica del modelo experimental, para lo cual se calcularon los eigenvalores correspondientes, en donde se observa y se comprueba que existe la minimización del contenido en el porcentaje de lignina removido, al presentar los valores propios valores positivos.

$$y = 80.5 + 0.0248w_1^2 + 0.0703w_2^2 + 0.2664w_3^2 \quad (3.17)$$

En la Figura 3.8 se observan los puntos estacionarios determinados en la ec. 3.15 más claramente en las gráficas de contornos notando que el rango de tiempo se encuentra entre 38 y 42 h, una concentración de 7.8 y 8.5 % y RSL de 15 y 19 g: mL, las cuales fueron comparadas contra los resultados establecidos en otros trabajos mostrados a continuación:



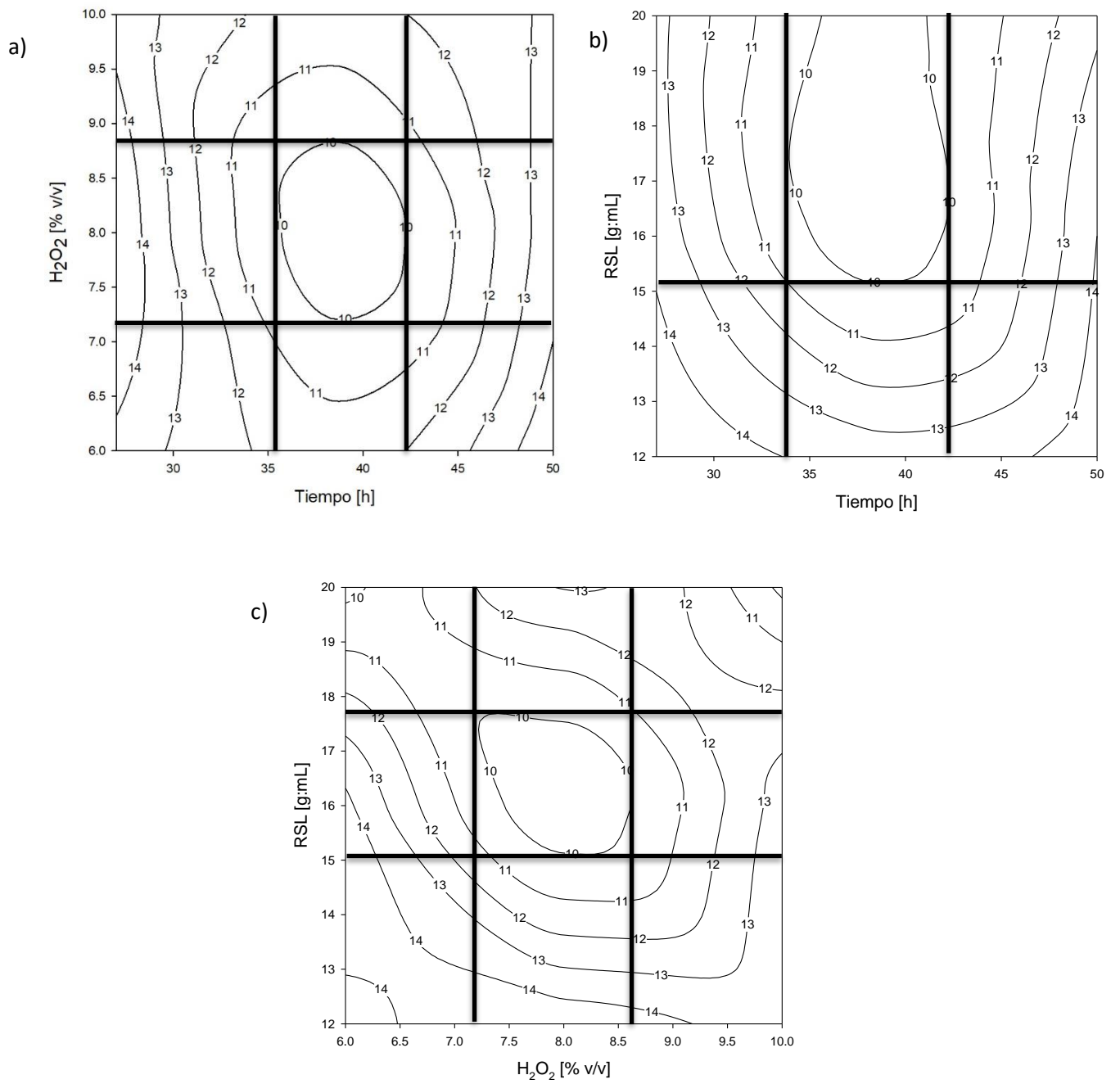


Figura 3.8 Gráficos de contornos del proceso de hidrólisis alcalina sobre  $RM_P$ ; a) Tiempo [h] vs  $H_2O_2$  [%v/v]; b) Tiempo [h] vs RSL [g:mL]; c)  $H_2O_2$  [%v/v] vs RSL [g:mL].

Rodríguez *et al.*, (2017) evaluó el efecto de distintas condiciones de pretratamiento secuencial ácido-base de aserrín de pino, sobre la liberación de azúcares reductores en la etapa de sacarificación. El material lignocelulósico fue pretratado en dos etapas, donde en la primera, se realizó con ácido sulfúrico y la segunda con hidróxido de sodio, resultando un porcentaje de remoción de lignina de 57.07 %, sin embargo la concentración utilizada fue más elevada, lo que genera un incremento monetario involucrado en la experimentación, lo que dio como resultado un 36.82 % mayor de remoción a lo presentado en este trabajo, en el que se obtuvo una remoción de 36.0537 %.

Benitez *et al.*, (2018) estudiaron las mejores condiciones para lograr la deslignificación del aserrín de Pino, alcanzando las mejores condiciones de deslignificación al emplear hidróxido de sodio al 12 %, donde obtuvieron un porcentaje final de 10.11 % lo cual resulta un 10.2 % mayor en lo reportado en este trabajo, ya que se obtuvo un porcentaje final de 9.0711 % teniendo una remoción de 36.0537 %.

Stoffel (2016) aplicó el concepto de biorrefinería a los residuos generados en la industrialización primaria de pino mediante el diseño y optimización de un proceso de fraccionamiento secuencial de la biomasa, para el aprovechamiento integral de todos los componentes del residuo utilizando pretramientos previos con ácido y también alcalinos, donde obtuvo una remoción de 27.25 % de lignina, lo que representa un 32.30 % de mayor remoción en este trabajo.

### 3.5 Evaluación de maderas puras reduciendo el tamaño de partícula

Se llevó a cabo una comparación en la reducción del porcentaje de lignina en base a una reducción de partícula estableciendo los valores óptimos para  $RM_C$  descritos en la sección 3.4.1 y también la optimización de  $RM_P$  establecidos en la sección 3.4.2 evaluando las tres variables de operación mostradas en la Tabla 3.6 se determinó el porcentaje de lignina final en la muestra.

Tabla 3.6 Condiciones óptimas de operación en la reducción de partícula para  $RM_C$  y  $RM_P$ .  $\sigma = 0.58$

Muestra	Tamaño de partícula (mm)	Tiempo [h]	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%v/v)	RSL [g: mL]	% Lignina $RM_C$
1 $RM_C$	0.21	38.1	8.4	16.6	8.1026
2 $RM_C$	0.21	38.1	8.4	16.6	8.9036
3 $RM_C$	0.23	38.1	8.4	16.6	8.1361
4 $RM_C$	0.23	38.1	8.4	16.6	8.5529
5 $RM_C$	0.40	38.1	8.4	16.6	8.9366
6 $RM_C$	0.40	38.1	8.4	16.6	8.1211
7 $RM_P$	0.21	38.7	8.1	18.4	9.6690
8 $RM_P$	0.21	38.7	8.1	18.4	9.1787
9 $RM_P$	0.23	38.7	8.1	18.4	9.2417
10 $RM_P$	0.23	38.7	8.1	18.4	9.0323
11 $RM_P$	0.40	38.7	8.1	18.4	9.6524
12 $RM_P$	0.40	38.7	8.1	18.4	9.5364

Los valores encontrados con el menor porcentaje de lignina para  $RM_C$  fue en la muestra 1 obteniendo un porcentaje de lignina final de 8.1026 utilizando un tamiz de malla 70, teniendo una remoción final de 45.54 % con respecto al valor obtenido en la caracterización inicial.

Mientras que para  $RM_P$  el valor con el menor porcentaje de lignina fue en la muestra 10 donde se obtuvo 9.0323 % utilizando un tamiz de malla 80, lo que generó una

remoción de 36.34 % con respecto a la caracterización realizada, que representó un ligero incremento en la remoción de lignina en comparación con el valor final encontrado en el apartado 3.4.2 donde se muestra la optimización de RMP sin considerar la reducción de partícula con un 0.42 % más de remoción.

Rios *et al.*, (2013), determinó la composición teniendo muestra de madera de pino, llevando a cabo una hidrólisis con ácido diluido y deslignificación alcalina utilizando hidróxido de sodio reduciendo el tamaño de la muestra mediante una malla 30, teniendo un valor inicial de lignina de 18.5 %, donde al final del proceso se tuvo una remoción de 15.40 %, que haciendo una comparación, en este trabajo se obtuvo un 42.2 % más de remoción final.

García (2014), trabajó como materia prima, residuos de madera de cedro, realizando la caracterización química llevando a cabo pretratamiento ácido-alcalino utilizando para reducir el tamaño de partícula una Malla 40, teniendo una remoción de 36.9 % con respecto a su caracterización. Lo que resultó que en este trabajo se obtuviera un 23.41 % mayor de remoción.

Soto *et al.*, (2010) utilizó como materia prima madera de pino reduciendo el tamaño de partícula con mallas 20 y 40, realizando pretratamiento previos como el ácido y alcalino mediante ácido diluido por medio de un autoclave y con hidróxido de sodio teniendo una remoción de lignina de 23.41 % y en comparación, en este trabajo se obtuvo un 35.5 % mayor de remoción.

### **3.6 Comparación de la remoción de lignina utilizando diferentes tipos de maderas.**

En el presente trabajo se estudió una mezcla de maderas (RM) y dos tipos diferentes de maderas puras (RM<sub>C</sub>, RM<sub>P</sub>), los cuales al ser analizados mediante la metodología de diseño de experimentos, permitió determinar las condiciones óptimas de operación para cada una de ellas que se muestran en la Tabla 3.7, donde también se observa el porcentaje de remoción final en cada tipo.

Tabla 3.7 Comparación de parámetros óptimos y remoción de lignina para RM, RM<sub>C</sub> Y RM<sub>P</sub>

Tipo de madera	Tiempo (h)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (% v/v)	RSL (g:mL)	Remoción de lignina (%)
RM	38.9287	7.9838	16.1032	42.5
RM <sub>C</sub>	38.1976	8.4163	16.6510	46.08
RM <sub>P</sub>	38.7130	8.2027	18.4821	36.05

Se observa que el Tiempo y la RSL, mantienen una gran similitud con una variación del  $\pm 0.0081\%$  y del  $\pm 0.010\%$  para el Tiempo, mientras que para RSL, resultó una variación del  $\pm 0.082$  y del  $\pm 0.057$ . Sin embargo, para la maderas puras, se requirió una mayor concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para el RM<sub>C</sub> un 5.41 % más y para el RM<sub>P</sub> un 2.71 % mayor de concentración. De las condiciones óptimas encontradas, se observa que la mayor remoción se obtuvo con la madera pura de cedro, lo cual se puede deber a la elevada concentración utilizada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para poder lograr una mayor desorganización dentro de su estructura molecular pudiendo remover una elevada cantidad de lignina. En tanto que la menor remoción se observa en la madera pura de pino, debido a que es considerada una madera blanda y al tener un periodo de crecimiento rápido, por lo que su composición no logra su adecuado desarrollo, no permite una buena aceptación para lograr una mayor remoción. La remoción de lignina favorece la producción de azúcares fermentables y dada la remoción obtenida en la mezcla de maderas, se puede garantizar un proceso eficiente, sin necesidad de realizar una separación previa de las mismas.

## CONCLUSIONES

Es necesario la utilización a mayores concentraciones de los agentes oxidativos debido a que el material utilizado fue una mezcla de maderas no controlada, por lo cual a bajas concentraciones no hubo una influencia en el rompimiento de los polímeros presentes en la materia prima empleada, lo que originaba bajas remociones de lignina.

Los puntos medios del diseño empleado son los que presentaron una mayor influencia en la respuesta, con los cuales se ha alcanzado una mayor remoción del contenido de lignina presente en la materia prima.

La reacción es altamente agresiva al momento, ya que es instantánea al lograr un incremento en el volumen de casi cinco veces el volumen inicial alcanzando temperaturas elevadas de hasta 100 °C.

Al llevar a cabo este estudio con los dos diferentes tipos de madera utilizando el diseño óptimo encontrado para la mezcla de madera, se logró la optimización para cada una de ellas, donde se notó un comportamiento similar de la materia prima, evidenciado en el porcentaje de lignina presente en la muestra luego de llevar a cabo los pretratamientos, obteniendo una minimización del proceso de reducción de lignina.

El porcentaje de lignina en RM resulta menor al presentarse un valor del 13.79 %, teniendo una reducción del 38.41 %, lo cual favorecerá al proceso que se va a efectuar al tener un menor porcentaje.

La reducción del tamaño de partícula en el caso de RMC no favorece ya que presentó un valor final de lignina mayor al presentado en la optimización del proceso, con una remoción de 45.54 %. Mientras que para RMP si favoreció la reducción en el tamaño de la muestra al obtener un 0.42 % más de remoción a lo presentado en la optimización y un 36.34% con respecto a su caracterización.

**REFERENCIAS**

**BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abril, A y Navarro, E. 2012. Etanol a partir de la biomasa lignocelulósica. Aleta ediciones. Alicante, España. ISBN: 978-84-15225-50-8
- Alejos, C. y Calvo, E. 2015. Biocombustibles de primera generación. Revista Peruana de Química e Ingeniería Química. **2**, 19-30  
<http://doi.org/10.19136/era.a4n12.97765>
- Álvarez, M. 2013. Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico. Economía Informa. **359** (63-89).
- Benítez. J.A., Sarria-Villa J., Gallo-Corredor, R. 2018. Condiciones óptimas de deslignificación del aserrín de *Pinus patula* como etapa crucial en la obtención de bioetanol. Informador Técnico, **82**(2), 160-171  
<http://doi.org/10.23850/22565035.1401>
- Dhimas, R. D., Tanda, V. W., Philip, Y.W. 2014. Comparative study on two-step concentrated acid hydrolysis for the extraction of sugars from lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, **164**, 221- 231.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.084>
- Gómez, E. A., y Ríos, L. A. 2013. Efecto del Pretratamiento de Biomasa Maderera en el Rendimiento a Etanol. Información Tecnológica **24**(5), 113–122. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642013000500013>
- González G. B., García C. M. 2013. Obtención de Bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo. Fermentación conjunta de los penta y hexa carbohidratos con *Pichia stipitis*. Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid.
- Gracia, C., 2011. Biocombustibles: ¿energía o alimento?, Bioetanol. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. **4**, 77-103. ISSN: 1666-5171
- Jaramillo, O, J., 2013. Hidrólisis ácida de materiales lignocelulósicos y detoxificación por pervaporación. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Manizales Colombia
- Jaramillo, T. D., Morales, V. S., Quintero D. J. 2017. Evaluación de pretratamientos químicos sobre materiales lignocelulósicos. Ingeniare. Revista chilena de ingeniería, **25**(4), 733-743. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-33052017000400733>



- Lacerda, V. da S. 2015. Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos para la producción de biocombustibles y bioproductos. Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid. Valladolid
- Lara, M., 2015. Bioetanol en su uso como combustible. La ecología verde. Editorial Media. España
- López, N., Cárdenas A., Zambrano, R., 2013. Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos. Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia. **69**, 317-326. <http://doi.handle.net/10495/5461>
- Mariante, A., Maciel, J., Siqueira, C. 2014. Bioetanol de caña de azúcar, energía para el desarrollo sostenible. BNDES Y CGEE. Rio de Janeiro. ISBN:978-85-87545-26-8
- Masera, O., Bustamante, C., 2017. Estado del Arte de la Bioenergía en Mexico. Red temática de Bioenergía (RTB) del Conacyt. México. ISBN: 978-607-8389-11-7.
- Medina-Morales Miguel A., Lorena Lara-Fernández, Cristóbal N. Aguilar, Heliodoro de la Garza-Toledo 2011. Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol como carburante. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila, Acta Química Mexicana. Saltillo, Coahuila, México. **3(6)**, 35-41.
- Montgomery Douglas C., 2013. Design and analysis of experiments, 8th edition, Edit. Wiley, ISBN 978-1-118-14692-7
- Morales, R. S, 2015. Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.
- Morales, M. J.L. 2019. Estudio de la Producción de etanol mediante cultivo por lotes y continuo. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. Orizaba, Veracruz.
- Navarro E. 2012. Bioetanol a partir del aprovechamiento de biomasa lignocelulósica. Aleta Ediciones. España ISBN: 978-84-15225-50-8

- Parameswaran, B., Raveendran, S., 2011, Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. In Biofuels, ed., Biofuels: Alternative feedstocks and conversion processes. Academic Press, Burlington, 261-268. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00010-3>
- Permingeat, H. 2017, Biocombustibles de segunda generación. Aapresid, 13-16. ISSN:0138-6204
- Pezoa, R., 2010. Estudio de pretratamiento con ácido diluido y líquidos iónicos en residuos agrícolas para la producción de bioetanol de segunda generación. Tesis de Maestría. Universidad de Chile. Santiago de Chile.
- Prinsen, Pepijn: 2010. Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas. Instituto De Recursos Naturales Y Agrobiología De Sevilla (Irnas) Consejo Superior De Investigaciones Científicas (CSIC) Sevilla, España.2-2
- Ramos, F. D., Villar, M. A. 2016. ¿Qué son los biocombustibles y qué lugar ocupan en el panorama energético mundial?, Ciencia Hoy, **25**(147), 69–73. <http://doi.org/169424-893001>
- Rodríguez, M. D., Castrillo, M. L., Velázquez, J. E., Kramer, G. R., Sedler, C., Zapata, P. D., Villalba, L. 2017. Obtención de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino pretratado secuencialmente con ácido-base. Revista Internacional de Contaminacion Ambiental, **33**(2), 317–324. <http://dx.doi.org/10.20937/rica.2017.33.02.12>
- Sánchez J. V. 2018. Tipos de Maderas: Características y Clasificación, Ecología Verde, 14 24-35. <http://dx.doi.org/1998:65-70>
- Sánchez Riaño, A.M.; Gutiérrez Morales, A. I. . M. H., J. A. y Rivera Barrero, C. A. 2010. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. Tumbaga, **5**, 61–91. <http://dx.doi.org/10.21829/myb.1998.411368>
- Sifontes, M. C., y Domine, M. E. 2013. Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. Avances en Ciencias e Ingeniería **4**, 15-46. <http://doi.org/323629-266003>

- Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Templeton D., and Crocker D., 2012. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, laboratory analytical procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42618.
- Stoffel, R. B., Felissia, F. E., Curvelo, S., Gassa, L. M., Area, M. C. 2016. Desresinación Alcalina Y Tratamiento Ácido De Aserrín De Pino Destinado a Biorrefinería. The 45th ABTCP International Pulp and Paper Congress, October, 8-10. 2012, Sao Paulo Brazil., (Jacobó 2005), 9–11. <http://dx.doi.org/376-4422198>
- Téllez, J., Fregoso, J., Rutiaga, J., González, R. 2017. Alternative uses of sawmill industry waste. Revista RCHSCFA. **13**(2). Pp: 243-260. Doi: <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchscfa.2016.06.040>.
- Urrelo, D. F., Leal, D. L., Boz, C. 2016. Chemical content of the wood of *tabebuia impetiginosa* (mart. ex dc) standley from rural community Ocho Hermanos, municipality el Carmen Rivero Torrez, department of Santa Cruz. Revista Boliviana de Química, **33**(3), 104-115. <http://dx.doi.org/0250-5460>

# **ANEXOS**

**Anexo A****Determinación de humedad mediante TermobalanzaAMB-50**

**Metodología por: Manual de operación de Termobalanza AMB-50 (P.N. 6157, Español, Revisión L6, Marzo 2006)**

**Procedimiento:**

1. Conectar la termobalanza a la toma de corriente.
2. Abrir la cubierta del equipo y limpiar perfectamente el platillo metálico.
3. Tarar la termobalanza oprimiendo el botón "Tare".
4. Depositar la muestra a la cual se le determinará la humedad, la cantidad de muestra recomendada debe de ser alrededor de  $\pm 0.5$  g (peso marcado por la propia termobalanza).
5. Cerrar la cubierta del equipo y comenzar el proceso oprimiendo el botón "start".
6. Dejar funcionar el equipo durante 30 min ininterrumpidos.
7. Al finalizar el tiempo establecido, la termobalanza proporcionará un número en su pantalla, el cual corresponde al número de Sólidos Totales, este dato debe anotarse debido a que se utilizará posteriormente.
8. Retirar el platillo metálico de la termobalanza y eliminar la muestra analizada, limpiar perfectamente la termobalanza, y desconectar el equipo.
9. La humedad de la muestra se calcula mediante la ecuación A1.1

$$\% \text{Humedad} = 100\% - ST \quad (A1.1)$$

Dónde: *ST* es el Número de sólidos totales determinados (%).

## Anexo B

### Determinación de carbohidratos estructurales y lignina en la biomasa

Procedimiento analítico de laboratorio (REGAZO)

Fecha de publicación: abril de 2008, Fecha de revisión: agosto de 2012

(Versión 08-03-2012)

Procedimiento

1. Preparar la muestra para análisis e hidrolizar.
  - 1.1 Colocar un número adecuado de crisoles filtrantes en el horno de mufla a  $575 \pm 25$  ° C durante un mínimo de 4 h. Retirar los crisoles del horno directamente en un desecador y enfríe durante un período de tiempo específico, se recomienda una hora. Pesar los crisoles con una precisión de 0.1 mg y registrar este peso. Es importante mantener los crisoles en un orden determinado, si no están marcados con identificadores. Las calcomanías de marcado permanente están disponibles en Wale Apparatus. No marque la parte inferior del crisol filtrante con un marcador de porcelana, ya que esto impedirá la filtración.
  - 1.2 Volver a colocar el crisol en el horno de mufla a  $575 \pm 25$  ° C y la ceniza a peso constante. El peso constante se define como menos de  $\pm 0.3$  mg de cambio en el peso sobre una hora de recalentamiento del crisol.
  - 1.3 Pesar  $300.0 \pm 10.0$  mg de la muestra a tratar en un tubo de ensaye de capacidad de 20 mL previamente tarado en la balanza. Registre el peso con una precisión de 0.1 mg. Cada muestra debe ser analizada en duplicado, como mínimo.
  - 1.4 Añadir  $3.00 \pm 0.01$  mL de ácido sulfúrico al 72% a cada tubo de ensaye. Se realizó agitación manual para mezclar bien durante un lapso de un minuto, o hasta que la muestra esté bien mezclada.
  - 1.5 Colocar el tubo de ensayo en un baño de agua ajustado a  $30 \pm 3$  ° C e incubar la muestra durante  $60 \pm 5$  min. Se agita la muestra cada 5 a 10 min sin retirar

la muestra del baño. La agitación es esencial para asegurar un contacto uniforme entre ácido y partículas y una hidrólisis uniforme.

- 1.6 Una vez completada la hidrólisis de 60 min, retirar los tubos del baño de agua. Diluir el ácido a una concentración del 4% añadiendo  $84.00 \pm 0.04$  ml de agua destilada. Se vierte el contenido de los tubos de ensaye en cada uno de los frascos de 250 mL con tapa de baquelita utilizando parte de los 84 mL para la dilución. Se mezcla la muestra invirtiendo el tubo varias veces para eliminar la separación de fases entre capas de ácido de alta y baja concentración

Nota: El volumen de la solución al 4% será de 86.73 mL, como se demuestra en siguientes cálculos.

- Densidad 72%  $\text{H}_2\text{SO}_4 = d_{72\% \text{H}_2\text{SO}_4} = 1.6338 \text{ g / mL}$
- Densidad  $\text{H}_2\text{O} = d_{\text{H}_2\text{O}} = 1.00 \text{ g / mL}$
- Densidad 4%  $\text{H}_2\text{SO}_4 = d_{4\% \text{H}_2\text{SO}_4} = 1.025 \text{ g / mL}$

- a. El peso de 3.00 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 72% es:

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

- b. La composición de 3 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 72% es:

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

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

- c. La concentración de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  después de la dilución es:

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

- d. El volumen total de solución presente después de la dilución es:

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

- 1.7 Preparar un conjunto de normas de recuperación del azúcar (SRS) que se tomarán a través de la hidrólisis restante y se utilizarán para corregir las

pérdidas debidas a la destrucción de azúcares durante la hidrólisis ácida diluida. SRS debe incluir D - (+) glucosa, D - (+) xilosa, D (+) galactosa, - L (+) arabinosa y D - (+) manosa. Las concentraciones de azúcar SRS deben elegirse para que se parezcan más a las concentraciones de azúcares en la muestra de ensayo. Pesar las cantidades requeridas de cada azúcar, a 0.1 mg más cercano, y agregar 10.0 ml de agua desionizada. Añadir 348 µl de ácido sulfúrico al 72%. Transfiera el SRS a un tubo de presión y la tapa firmemente.

1.7.1 No se requiere un SRS nuevo para cada análisis. Se puede producir una gran cantidad de patrones de recuperación de azúcar, se filtran a través de filtros de 0.2 µm, se dispensan en alícuotas de 10.0 mL en recipientes sellados y se etiquetan. Pueden almacenarse en un congelador y retirarse cuando sea necesario. Descongele y vértice el SRS congelado antes de usarlo. Si se usan SRS congelados, se añade la cantidad apropiada de ácido a la muestra descongelada y se agita en vértice antes de transferirla a un tubo de presión.

1.8 Colocar los tubos de ensayo en la autoclave. Autoclave las muestras selladas y las normas de recuperación de azúcar durante una hora a 121 °C. Después de completar el ciclo de autoclave, deje que los hidrolizados se enfríen lentamente a temperatura ambiente cercana antes de retirar las tapas. (Si no se lleva a cabo la etapa 2.1 extraiga una alícuota de 10 mL del licor para usar en la etapa 5)

2 Analizar la muestra para la lignina insoluble en ácido.

2.1 Filtrar en vacío la solución de hidrolizada después de terminado el ciclo en la autoclave a través de crisoles filtrantes previamente pesados. Capture el filtrado en un matraz filtrante.

2.2 Transferir una alícuota, aproximadamente 50 ml, en una botella de almacenamiento de muestras. Esta muestra se usará para determinar lignina



soluble en ácido así como carbohidratos. La determinación de lignina soluble en ácido debe realizarse dentro de las 6 h siguientes a la hidrólisis. Si el licor de hidrólisis debe almacenarse, se debe almacenar en un máximo de dos semanas. Es importante recoger la alícuota de licor antes de continuar con el paso 2.3.

2.3 Utilizar agua destilada para transferir cuantitativamente todos los sólidos restantes del tubo de ensaye al crisol filtrante. Enjuague los sólidos con un mínimo de 50 ml de agua destilada. Se puede usar agua destilada caliente en lugar de agua a temperatura ambiente para disminuir el tiempo de filtración.

2.4 Secar el crisol y el residuo insoluble en ácido a  $105 \pm 3$  °C en a estufa hasta que se consiga un peso constante, usualmente un mínimo de cuatro horas.

2.5 Retirar las muestras de la estufa y enfriar en un desecador durante una hora. Registrar el peso del crisol y el residuo seco a 0.1 mg.

2.6 Colocar los crisoles y el residuo en el horno de mufla a  $575 \pm 25$  °C durante 2h. Esperar un tiempo específico, alrededor de 6 h, a que baje la temperatura hasta 100° C

2.7 Retirar cuidadosamente el crisol del horno directamente en un desecador y enfríelo durante un tiempo de 30 min. Pesar los crisoles y la ceniza a 0.1 mg más cercano y registrar el peso. Coloque los crisoles de nuevo en el horno y la ceniza a un peso constante.

3 Analizar la muestra para la lignina soluble en ácido como sigue.

3.1 En un espectrofotómetro UV-Visible, ejecutar un fondo de agua destilada o ácido sulfúrico al 4%.

3.2 Usando la alícuota de licor de hidrólisis obtenida en la etapa 2.2, mida la absorbancia de la muestra a una longitud de onda apropiada en un

espectrofotómetro UV-Visible. Consulte la Tabla B1 para conocer los valores de longitud de onda sugeridos.

Tabla B1 Longitudes de onda sugerida para el espectro UV

Tipo de Biomasa	Lambda Max (nm)	Absortividad a Lambda máx. (L / g cm)	Longitud de onda recomendada (nm)	Absortividad a longitud de onda recomendada (nm)
Pinus Radiata - NIST SRM 8493	198	25	240	12
Bagasse- NIST SRM 8491	198	40	240	25
CornStover- NREL fuente de alimentación suministrada	198	55	320	30
Populus deltoides- NIST SRM 8492	197	60	240	25

Diluir la muestra según sea necesario para llevar la absorbancia al rango de 0.7-1.0, registrando la dilución. Se puede usar agua destilada o ácido sulfúrico al 4% para diluir la muestra, pero el mismo disolvente debe usarse como blanco. Registre la absorbancia a tres decimales. La reproducibilidad debe ser de  $\pm 0.05$  unidades de absorbancia. Analizar cada muestra por duplicado, como mínimo. (Este paso debe realizarse dentro de las seis horas siguientes a la hidrólisis.)

3.3 Calcule el peso en seco del horno (ODW) de la muestra libre de extractivos, usando el contenido promedio de sólidos totales.

$$ODW = \frac{\text{Muestra peso aire seco} \times \% \text{ Sólidos totales}}{100} \quad (B1.1)$$

3.4 Calcular la cantidad de lignina soluble en ácido presente en la muestra mediante el cálculo con la ecuación B.1.2

$$\%ASL = \frac{UVabs \times \text{Volumen de filtracion} \times \text{Dilusión}}{\epsilon \times \text{muestra de ODW} \times \text{Pathlength}} \times 100 \quad (B1.2)$$

Dónde: UVabs es la absorbancia UV-Vis promedio para la muestra en la longitud de onda apropiada (ver Tabla B2)

Líquido de hidrólisis en volumen = volumen de filtrado (86.73 ml)

$$Dilución = \frac{Muestra\ de\ volumen + Disolvente\ de\ dilución\ del\ volumen}{Muestra\ de\ volumen} \quad (B1.3)$$

Donde:  $\epsilon$  es la Absortividad de la biomasa a una longitud de onda específica (ver tabla B1), la Muestrade ODW es el peso de la muestra (mg) y Pathlength es la trayectoria de la celda UV-Vis (Ancho de la celda en cm)

#### 4 Analizar la muestra para los carbohidratos estructurales.

4.1 Preparar una serie de normas de calibración que contengan los compuestos que se van a cuantificar, haciendo referencia a la Tabla B.2 para el rango de concentración sugerido. Utilice un punto de cuatro calibraciones. Si los estándares se preparan fuera de los rangos sugeridos, el nuevo rango para estas curvas de calibración debe ser validado.

Tabla B.2 Intervalos de concentración sugeridos para normas de calibración

Componente	Rango de concentración sugerido (mg / ml)
D-celobiosa	0.1-4.0
D(+)-glucosa	0.1-4.0
D(+)-xilosa	0.1-4.0
D(+)-galactosa	0.1-4.0
L(+)-arabinosa	0.1-4.0
D(+)-manosa	0.1-4.0
CVS	Medio del rango lineal, la concentración no es igual a un punto de calibración (se sugiere 2.5)

- 4.2 Preparar un estándar independiente de verificación de calibración (CVS) para cada conjunto de normas de calibración. Utilice reactivos de una fuente o lote distintos de los utilizados en la preparación de los estándares de calibración. Prepare el CVS a una concentración que caiga en medio del rango validado de la curva de calibración. El CVS debe analizarse en la HPLC después de cada conjunto de calibración ya intervalos regulares a lo largo de la secuencia, agrupando grupos de muestras. El CVS se utiliza para verificar la calidad y la estabilidad de la (s) curva (s) de calibración a lo largo de la ejecución.
- 4.3 Usando el licor de hidrólisis obtenido en la etapa 2.2, transfiera una alícuota de aproximadamente 20 ml de cada licor a un matraz Erlenmeyer de 50 ml.
- 4.4 Utilizar carbonato de calcio para neutralizar cada muestra a pH 5-6. Evite neutralizar a un pH mayor que 6 monitorizando con papel pH. Añadir el carbonato de calcio lentamente después de alcanzar un pH de 4. Remueva la muestra con frecuencia. Después de alcanzar el pH 5-6, detener la adición de carbonato cálcico, dejar reposar la muestra y decantar el sobrenadante. El pH del líquido después de la sedimentación será aproximadamente 7. (Nunca se debe permitir que las muestras excedan un pH de 9, ya que esto dará como resultado una pérdida de azúcares).
- 4.5 Preparar la muestra para el análisis de HPLC pasando el líquido decantado a través de un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  a un vial de muestreo automático. Sellar y etiquetar el vial. Prepare cada muestra por duplicado, reservando uno de los duplicados para su análisis posterior si es necesario. Si es necesario, las muestras neutralizadas se pueden almacenar en el refrigerador durante tres o cuatro días. Después de este tiempo, las muestras deben considerarse comprometidas debido al potencial crecimiento microbiano. Después del almacenamiento en frío, verificar las muestras de la presencia de un precipitado. Las muestras que contengan un precipitado deben ser filtradas de nuevo, mientras estén frías, a través de un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$ .

4.6 Analizar los patrones de calibración, CVS y muestras por HPLC usando una columna de azúcar Shodex SP0810 o BioradAminex HPX-87P equipada con la columna de protección apropiada.

Condiciones de HPLC:

- Volumen de inyección: 10-50  $\mu$ L, dependiendo de la concentración y los límites del detector
- Fase móvil: Agua de grado HPLC, 0.2  $\mu$ m filtrada y desgasificada
- Caudal: 0.6 ml/min
- Temperatura de la columna: 80-85 ° C
- Temperatura del detector: lo más cerca posible de la temperatura de la columna
- Detector: índice de refracción
- Tiempo de ejecución: 35 min

4.7 Compruebe los cromatogramas de la muestra de ensayo respecto a la presencia de celobiosa y azúcares oligoméricos. Los niveles de celobiosa mayores de 3 mg/ml indican hidrólisis incompleta. Las muestras frescas deben ser hidrolizadas y analizadas

4.8. Verificar los cromatogramas de la muestra de ensayo con respecto a la presencia de picos eluyendo antes de celobiosa (tiempo de retención de 4-5 min usando las condiciones recomendadas). Estos picos pueden indicar altos niveles de productos de degradación del azúcar en la muestra anterior, lo que es indicativo de una hidrólisis excesiva. Todas las muestras de los lotes que muestren evidencia de hiperhidrólisis deben tener muestras frescas hidrolizadas y analizadas.

5 Analizar la muestra con respecto al contenido de acetilo, si es necesario.

5.1 Preparar ácido sulfúrico 0.005 M (0.01 N) para su uso como fase móvil de HPLC. En un matraz aforado de 2 l, añadir 2.00 ml de ácido sulfúrico

normalizado 10 N y llevar al volumen con agua de grado HPLC. Filtrar a través de un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  y desgasificar antes de usar. Si no se dispone de ácido sulfúrico 10N, también se puede usar ácido sulfúrico concentrado. 278  $\mu\text{l}$  de ácido sulfúrico concentrado llevado al volumen en un matraz aforado de 1 L con agua de grado HPLC también producirán ácido sulfúrico 0.005 M.

### Anexo C

#### Hidrólisis alcalina de RM etapa 1

En la Tabla C1 se presenta el análisis de varianza obtenido en el análisis, en él se observan que las variables que interfieren y en su interacción son significativos.

Tabla C1. Análisis de Varianza del proceso de hidrólisis alcalina.

Fuente	GL	SC Ajust	MCAjust	Valor F	Valor P
Modelo	9	5.33793	0.59310	0.78	0.652
Lineal	3	0.20991	0.06997	0.09	0.962
Tiempo	1	0.15401	0.15401	0.20	0.672
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	0.01072	0.01072	0.01	0.910
RSL	1	0.04518	0.04518	0.06	0.818
Cuadrado	3	3.93544	1.31181	1.71	0.279
Tiempo*Tiempo	1	1.09891	1.09891	1.44	0.284
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> *H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	1.64096	1.64096	2.14	0.203
RSL*RSL	3	0.99362	0.99362	1.30	0.306
Interacción de 2 factores	3	1.19258	0.39753	0.52	0.687
Tiempo* H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	0.01003	0.01003	0.01	0.913
Tiempo* RSL	1	0.60396	0.60396	0.79	0.415
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> * RSL	1	0.57859	0.57859	0.76	0.424
Error	5	3.82646	0.76529		
Falta de ajuste	3	0.72991	0.24330	0.16	0.917
Error puro	2	3.09656	1.54828		
Total	14	9.16439			

Los valores indicados al obtener los puntos estacionarios es que la experimentación se debe llevar a cabo en un tiempo aproximado de 47.43 h, una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 3.96 % y una RSL de 14.87. Sin embargo, al obtener los eigenvalores, se notó que no se llegó a una minimización en el proceso, sino que se obtuvo un punto

de silla al obtener valores con diferentes signos, por lo que los puntos estacionarios se pueden tomar como mejores condiciones y para establecer un nuevo diseño de experimentos que lleve a la optimización.

En la Figura C1 se muestra la gráfica de residuos en el cual se muestra su comportamiento, donde se observa que no corresponde a una distribución normal contra sus valores esperados distribuidos aleatoriamente, notando unos puntos atípicos donde los intervalos de confianza ya que se generó una distribución con colas largas donde los valores no son confiables en la experimentación.

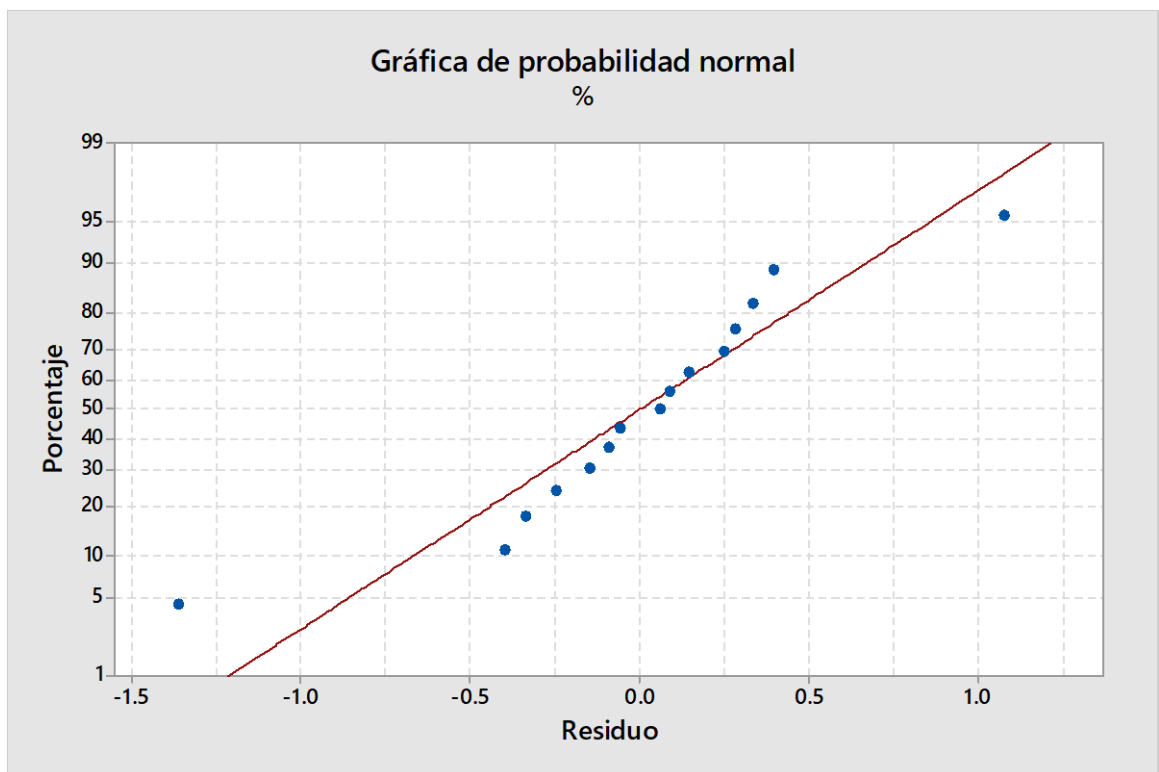


Figura C1. Gráfico de probabilidad del análisis del diseño experimental



## Anexo D

## Hidrólisis alcalina de RM etapa 2

Llevando a cabo el análisis estadístico, en la Tabla 2B se presenta el análisis de varianza obtenido se observa que las variables son significativas al obtener un valor de p mayor a 0.05.

Tabla D1 Análisis de varianza del proceso de hidrólisis alcalina

Fuente	GL	SC Ajust	MCAjust	Valor F	Valor P
Modelo	9	5.57192	0.6191	1.49	0.344
Lineal	3	2.99742	0.99914	2.41	0.183
Tiempo	1	0.13520	0.13520	0.33	0.593
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	0.93161	0.93161	2.24	0.194
RSL	1	1.93061	1.93061	4.65	0.084
Cuadrado	3	2.38364	0.79455	1.91	0.245
Tiempo*Tiempo	1	1.82650	1.82650	4.40	0.090
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> *H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	0.01366	0.01366	0.03	0.863
RSL*RSL	1	0.71754	0.71754	1.73	0.246
Interacción de 2 factores	3	0.19085	0.06362	0.15	0.923
Tiempo* H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	0.04203	0.04203	0.10	0.763
Tiempo* RSL	1	0.08122	0.08122	0.20	0.677
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> * RSL	1	0.06760	0.06760	0.16	0.703
Error	5	2.07584	0.41517		
Falta de ajuste	3	1.28498	0.42833	1.08	0.513
Error puro	2	0.79087	0.39543		
Total	14	7.64776			

Al llevar a cabo el análisis canónico, se encontró que los puntos estacionarios indican un valor de tiempo de 39.8013 h, una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 13.5176 % y una RSL de 15.9665 g: ml. Sin embargo, el análisis resulta un punto de silla, por lo cual no se logra la minimización correspondiente al encontrarse con valores con

diferente signo. Esto sirve como parámetro para poder establecer un nuevo diseño experimental para proceder a encontrar la optimización del proceso de hidrólisis alcalina.

En la figura D1 se muestra el gráfico de probabilidad en la que se observa una distribución con colas largas donde los datos no se ajustan uniformemente sobre la línea recta representando el modelo propuesto experimentalmente por lo que se propuso un nuevo análisis en base a los resultados buscando valores confiables.

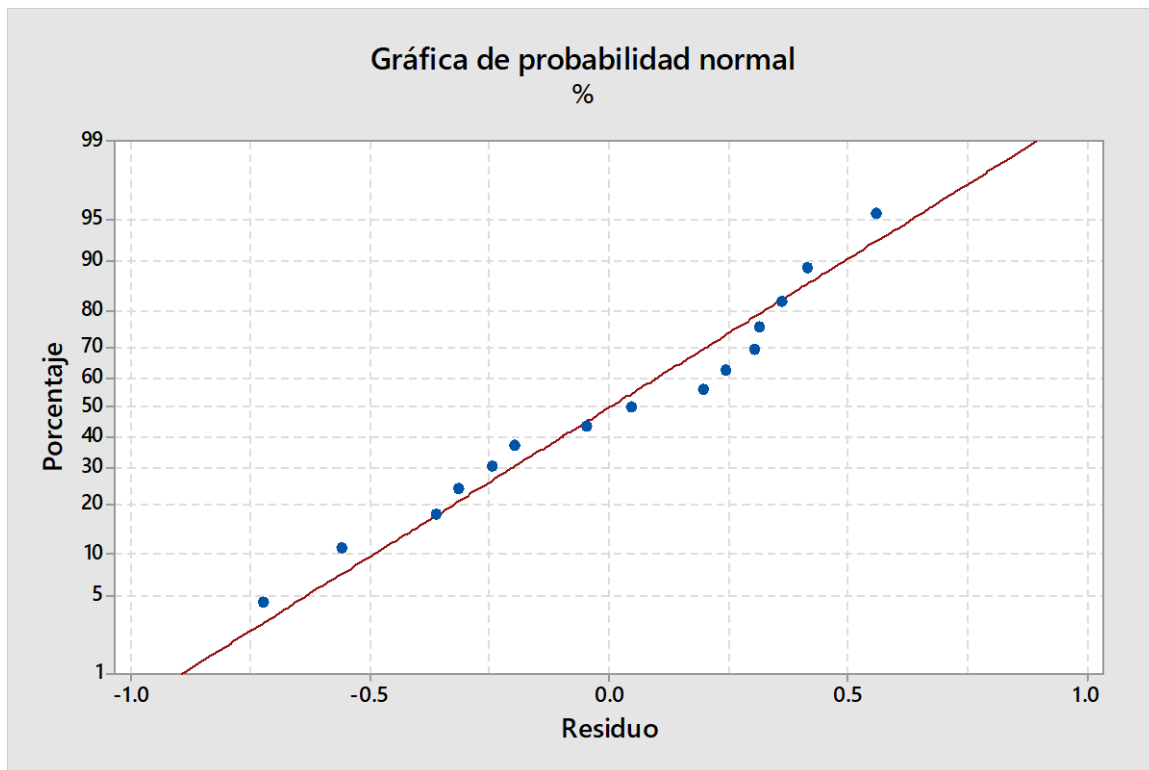


Figura D1. Gráfico de probabilidad del análisis del diseño experimental

## Anexo E

### Hidrólisis alcalina de RM optimizado

Llevando a cabo el análisis estadístico, en la Tabla 2B se presenta el análisis de varianza obtenido se observa que las variables son significativas al obtener un valor de p menor a 0.05

Tabla E1 Análisis de varianza del proceso de hidrólisis alcalina

Fuente	GL	SC Ajust	MCAjust	Valor F	Valor P
Modelo	9	64.8508	7.2056	49.30	0.000
Lineal	3	0.2100	0.0700	0.48	0.711
Tiempo	1	0.1541	0.1541	1.05	0.352
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	0.0107	0.0107	0.07	0.798
RSL	1	0.0452	0.0452	0.31	0.602
Cuadrado	3	63.4482	21.1494	144.70	0.000
Tiempo*Tiempo	1	11.1801	11.1801	76.49	0.000
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> *H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	32.1823	32.1823	220.18	0.000
RSL*RSL	1	29.0397	29.0397	198.68	0.000
Interacción de 2 factores	3	1.1926	0.3975	2.72	0.155
Tiempo* H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	0.0100	0.0100	0.07	0.804
Tiempo* RSL	1	0.6040	0.6040	4.13	0.098
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> * RSL	1	0.5786	0.5786	3.96	0.103
Error	5	0.7308	0.1462		
Falta de ajuste	3	0.7297	0.2432	453.09	0.002
Error puro	2	0.0011	0.0005		
Total	14	65.5816			

Al llevar a cabo el análisis canónico, se encontró que los puntos estacionarios indican un valor de tiempo de 38.9287 h, una RSL de 16.1032 g:mL y una

concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 7.9838 %. Lo cual el análisis generó la minimización correspondiente del proceso al encontrarse con valores del mismo signo.

En la Figura E1 se muestra el gráfico de probabilidad en la que se observan los residuos obtenidos del modelo experimental, donde todos se encuentran distribuidos aleatoriamente y dentro de la normalidad ajustados uniformemente sobre la línea recta por lo que, los valores predichos representan el modelo propuesto .

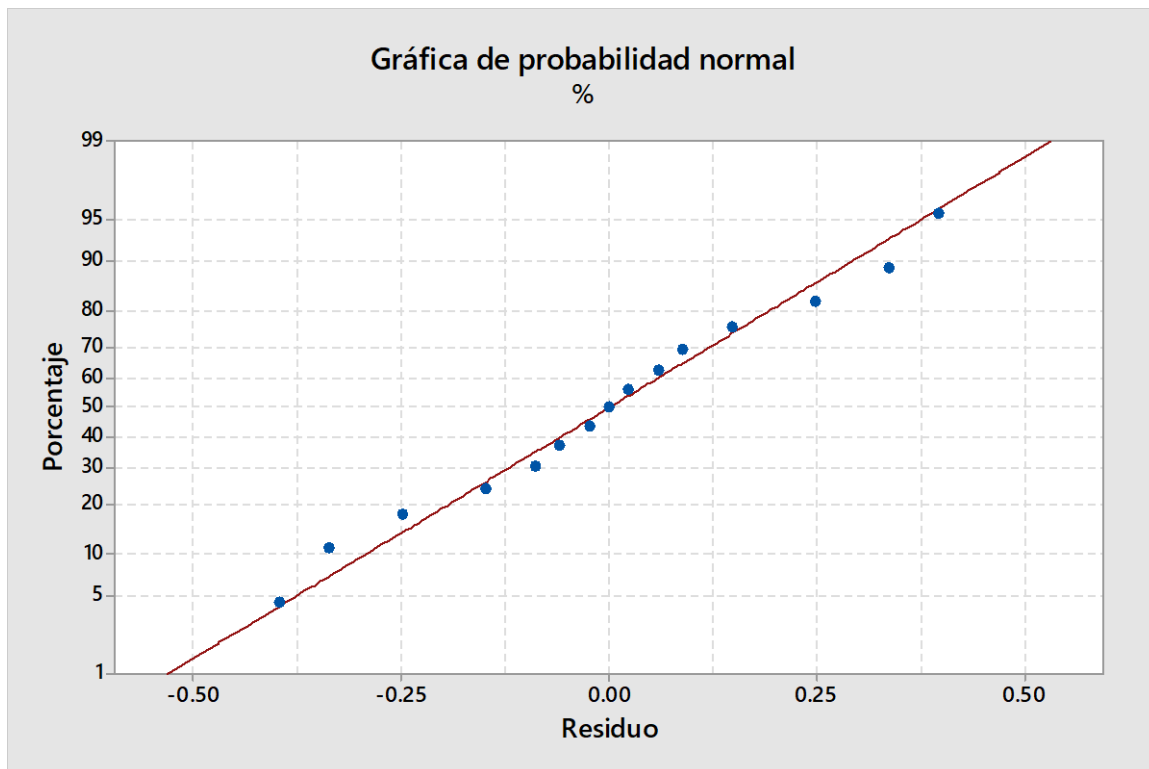


Figura E1. Gráfico de probabilidad del análisis del diseño experimental

## Anexo F

Estudio de la reducción de lignina en RM<sub>c</sub>

Llevando a cabo el análisis estadístico, en la Tabla 2B se presenta el análisis de varianza obtenido se observa que las variables son significativas al obtener un valor de p menor a 0.05

Fuente	GL	SC Ajust	MCAjust	Valor F	Valor P
Modelo	9	73.0787	8.1199	11.40	0.008
Lineal	3	3.1690	1.0563	1.48	0.326
Tiempo	1	0.4813	0.4813	0.68	0.448
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	1.4676	1.4676	2.06	0.211
RSL	1	1.2202	1.2202	1.71	0.248
Cuadrado	3	57.437	19.0146	26.69	0.002
Tiempo*Tiempo	1	34.8139	34.8139	48.87	0.001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> *H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	102692	10.2692	14.42	0.013
RSL*RSL	1	19.8265	19.8265	27.83	0.003
Interacción de 2 factores	3	12.8660	4.2887	6.02	0.041
Tiempo* H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	0.2040	0.2040	0.29	0.615
Tiempo* RSL	1	0.2550	0.2550	0.36	0.576
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> * RSL	1	12.4069	12.4069	17.42	0.009
Error	5	3.5616	0.7123		
Falta de ajuste	3	2.9086	0.9695	2.97	0.262
Error puro	2	0.6529	0.3265		
Total	14	76.6403			

Al llevar a cabo el análisis canónico, se encontró que los puntos estacionarios indican un valor de tiempo de 38.1976 h, una RSL de 16.6510 g:mL y una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 8.4163 % lo cual el análisis generó la minimización correspondiente de este tipo de residuo al encontrarse los eigenvalores con el mismo signo.

En la Figura F1 se muestra el gráfico de probabilidad en la que se observan los residuos obtenidos del modelo experimental, donde se observa una distribución dentro de la normalidad, encontrando los residuos distribuidos aleatoriamente, en el que el modelo propuesto se representa por los puntos ajustados sobre la línea recta por lo que los valores predichos son confiables durante la experimentación.

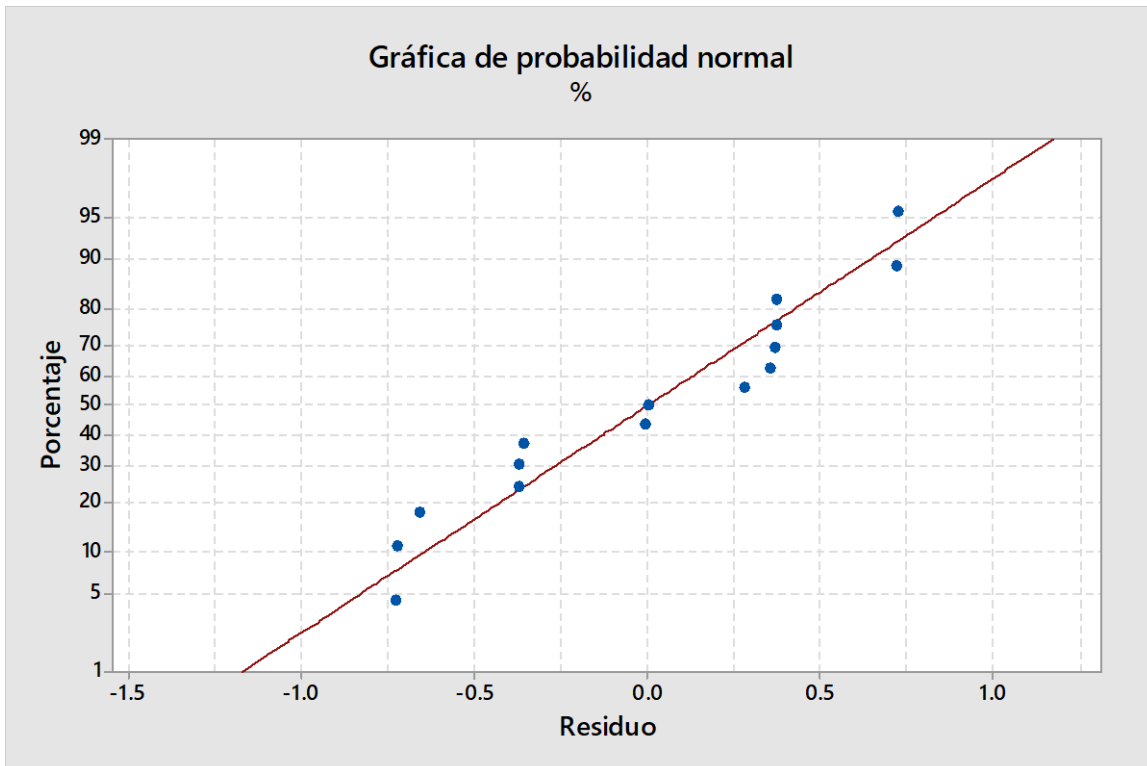


Figura F1. Gráfico de probabilidad del análisis del diseño experimental

## Anexo G

Estudio de la reducción de lignina en RM<sub>P</sub>

Llevando a cabo el análisis estadístico, en la Tabla 2B se presenta el análisis de varianza obtenido se observa que las variables son significativas en su interacción al obtener un valor de p menor a 0.05

Fuente	GL	SC Ajust	MCAjust	Valor F	Valor P
Modelo	9	61.9931	6.8881	11.11	0.008
Lineal	3	15.5778	5.1926	8.38	0.021
Tiempo	1	0.0036	0.0036	0.01	0.942
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	0.2170	0.2170	0.35	0.580
RSL	1	15.3572	15.3572	24.77	0.004
Cuadrado	3	45.6914	15.2305	24.57	0.002
Tiempo*Tiempo	1	40.7940	40.7940	65.80	0.000
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> *H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	4.1941	4.1941	6.76	0.048
RSL*RSL	1	4.6754	4.6754	7.54	0.040
Interacción de 2 factores	3	0.7239	0.2413	0.39	0.766
Tiempo* H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	0.6792	0.6792	1.10	0.343
Tiempo* RSL	1	0.0356	0.0356	0.06	0.820
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> * RSL	1	0.0091	0.0091	0.01	0.908
Error	5	3.1000	0.6200		
Falta de ajuste	3	2.8736	0.9579	8.46	0.108
Error puro	2	0.2264	0.1132		
Total	14	65.0932			

Al llevar a cabo el análisis canónico, se encontró que los puntos estacionarios indican un valor de tiempo de 38.7130 h, concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 8.2027 % y RSL de 18.4821 g:mL.% generando la minimización correspondiente del proceso de hidrólisis para este tipo de residuo.

En la Figura G1 se observa el gráfico de probabilidad en la que los residuos obtenidos del modelo experimental se encuentran en una distribución dentro de la normalidad, distribuidos aleatoriamente, donde los puntos se notan ajustados de manera uniforme sobre la línea recta por lo que los valores predichos son representativos de la experimentación.

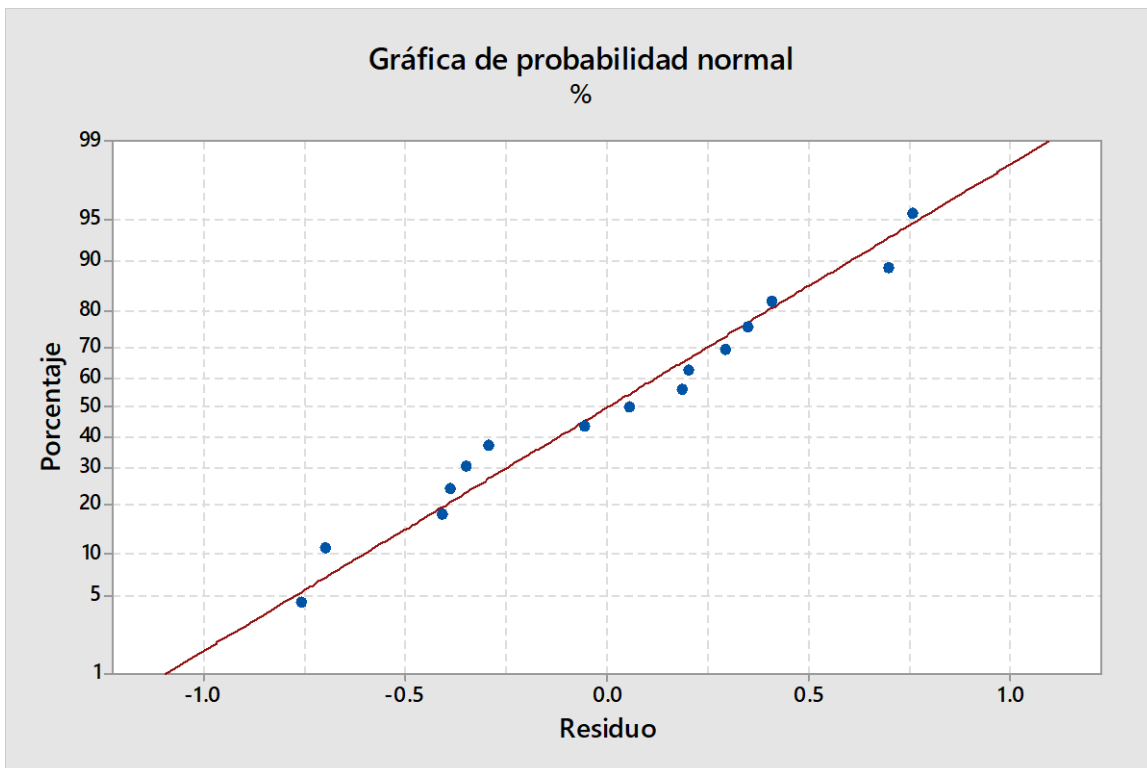


Figura G1. Gráfico de probabilidad del análisis del diseño experimental