



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PROPIEDADES ESTRUCTURALES QUE CONTROLAN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BAGAZO DE AGAVE PRE-TRATADO POR EXTRUSIÓN

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

ELY ANIRA BRAVO TAPIA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. José Federico del Río Portilla

Dr. Arturo Navarro Ocaña

Facultad de Química

Ciudad de México. Septiembre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedico este trabajo con un todo mi
amor y agradecimiento

a mi familia

Rodrigo, Celia, Itzú, Cocol y Benito

por su gran

cariño y apoyo incondicional

 Los amo familia 

Y a esos amigos que embriagan de

felicidad cada momento 

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece la beca recibida de CONACYT para estudios de maestría en la UNAM, el apoyo financiero del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) para mi estancia de investigación en Francia, a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII), a la Facultad de Química y posgrado de ciencias bioquímicas de la UNAM.

Un especial agradecimiento a los siguientes profesores que guiaron mi camino en la investigación y que me apoyaron para la realización de este estudio

*Dra. Carmina Montiel Pacheco
Dr. Oscar Hernández Meléndez
Dra. Guadalupe Vaca Medina
Dra. Minerva Monroy Barreto
Dra. Virginie Vandenbossche*

Se agradece a los miembros del comité tutor de la maestría.

*Dr. José Federico del Rio Portilla
Dr. Arturo Navarro Ocaña*

Se agradece el apoyo a mis sinodales en la maestría por sus valiosos comentarios que sirvieron para mejorar este trabajo.

*Dra. Farrés Gonzales-Sarabia Amelia María de Guadalupe
Dra. Montiel Pacheco Carmina
Dr. García Valdés José de Jesús
Dra. Sánchez Puig Nuria Victoria
Dra. Ayala Aceves Marcela*

Finalmente un cariñoso agradecimiento a mi tutor por apoyarme y dejarme ser parte este gran equipo de investigación.

Dr. Eduardo Bárzana García

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE GRÁFICAS DE RESULTADOS.....	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 PANORAMA MUNDIAL DEMOGRÁFICO, ENERGÉTICO Y AMBIENTAL.....	1
1.2 PANORAMA NACIONAL DEMOGRÁFICO, ENERGÉTICO Y AMBIENTAL	6
2. MARCO TEÓRICO	10
2.1 DEFINICIÓN DE BIOMASA.....	10
2.2 DEFINICIÓN DE BIOCOMBUSTIBLE.....	10
2.3 CLASIFICACIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES	10
2.4 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA DE SEGUNDA GENERACIÓN	13
2.4-1. Celulosa.....	13
2.4-2. Hemicelulosa.....	14
2.4-3. Lignina.....	15
2.5 AGAVE.....	18
2.6 BIOETANOL COMO BIOCOMBUSTIBLE Y SU PROCESO DE PRODUCCIÓN.....	19
2.6-1 Pretratamientos de material lignocelulósico	23
2.6-2 Características generales de los subproductos inhibitorios generados en el material lignocelulósico por la acción de un pretratamiento.....	25
2.7 EXTRUSIÓN	28
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. OBJETIVOS	30
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	31
6. METODOLOGÍAS EMPLEADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN	34
6.1 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	34
6.2 ESPECTROSCOPIA DE DIFRACCIÓN DE RX.....	35

6.3	ESPECTROSCOPIA DE TRANSMISIÓN DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER	35
6.4	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA	36
6.4-1	Condiciones de la técnica HPLC para la determinación de azúcares.....	36
6.4-2	Condiciones de la técnica HPLC para la determinación de compuestos inhibitorios	36
6.5.	SORCIÓN DINÁMICA DE VAPOR	38
7.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	40
7.1.	RESULTADOS DEL POTENCIAL DE SACARIFICACIÓN.....	40
7.1-1	Análisis de los resultados del potencial de sacarificación	40
7.2.	RESULTADOS DE LOS DIFRACTOGRAMAS POR RAYOS X.....	43
7.2-1	Análisis de los espectros de difracción de rayos X	47
7.3.	RESULTADOS DE LOS ESPECTROS POR FTIR	59
7.3-1	Análisis de los resultados de los espectros infrarrojos.....	62
7.4.	RESULTADOS DE LOS CROMATOGRAMAS POR HPLC	76
7.4-1	Análisis de los resultados de las concentraciones de los compuestos inhibitorios	77
7.5.	RESULTADOS DE LOS DIAGRAMAS DE ISOTERMAS POR DVS	87
7.5-1	Análisis de los resultados del contenido de área superficial y porosidad	88
7.6.	RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES QUE CORRELACIONA TODOS LOS LAS METODOLOGÍAS EMPLEADAS	93
8.	CONCLUSIONES.....	96
9.	RECOMENDACIONES.....	98
	BIBLIOGRAFIA.....	99
	ANEXO.....	103
	GENERALIDADES DEL POTENCIAL DE SACARIFICACIÓN	103
	GENERALIDADES DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X.....	104
	GENERALIDADES DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER	108
	GENERALIDADES DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	109
	GENERALIDADES DE LA SORCIÓN DINÁMICA DE VAPOR.....	109
	GENERALIDADES DEL ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES	110

ABREVIATURAS

- Mtoe:** Million tons of oil equivalent (Millones de toneladas equivalentes de petróleo)
- Mtce:** Million tons of coal equivalent (Millones de toneladas equivalentes de carbón)
- Bcm:** Billion cubic metres (Billones de metros cúbicos)
- HPLC:** High performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia)
- DVS:** Dynamic vapor sorption (Sorci3n dinámica de vapores)
- PCA:** Principal component analysis (Análisis de componentes principales)
- PCA1:** Principal component analysis one (Análisis de componentes principales uno)
- PCA2:** Principal component analysis two (Análisis de componentes principales dos)
- DTR:** Doble tiempo de residencia
- IC:** Índice de cristalinidad

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resumen de diferentes tipos de pretratamientos para materiales lignocelulósicos.	23
Tabla 2: Pruebas en el extrusor a diferentes condiciones de pre-tratamiento.....	32
Tabla 3: Composición de los diferentes gradientes de la fase móvil en la columna de HPLC.	38
Tabla 4: Resultados del porcentaje del rendimiento de la hidrólisis enzimática.....	40
Tabla 5: Designación de las principales bandas en el espectro FTIR del bagazo de agave y sus picos característicos más destacados.	62
Tabla 6: Concentración de inhibidores en las muestras hidrolizadas, los filtrados y su control (mg/L).	76
Tabla 7: Área superficial y promedio de volumen de poro de las diferentes muestras.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Suministro mundial de energía primaria (derecha) y de energías renovables (izquierda).	2
Figura 2: Historia y pronóstico de la demanda de energía mundial por fuente (1990-2040).	2
Figura 3: Concentraciones promedio anuales de PM _{2.5} ponderadas por población en 2015.	3
Figura 4: Correlación del incremento de la temperatura media global y los niveles de CO ₂ , 1880 a 2016.	4
Figura 5: Concentraciones de ozono ponderadas por población promedio estacional en 2015.	4
Figura 6: Principales sectores que expulsan emisiones de gases de efecto invernadero globales, 2010.	5
Figura 7: Estructura de la producción de energía primaria en México, 2016.	6

Figura 8: Porcentaje de fuentes renovables que incrementaron y disminuyeron en México, 2016.	7
Figura 9: Emisión nacional de contaminantes de origen antropogénico por contaminante, 2008.	7
Figura 10: Sectores que contribuyen a la contaminación en México, 2015.	8
Figura 11: Residuo de bagazo de agave.	9
Figura 12: Generaciones de biocombustibles.	12
Figura 13: Cadenas de láminas planas de celulosa.	13
Figura 14: Estructura química de la unidad de celobiosa.	14
Figura 15: Hexosas y pentosas típicamente encontradas en la hemicelulosa.	14
Figura 16: Estructura de la hemicelulosa.	15
Figura 17: Las tres unidades base fenil propano y sus subunidades que conforman la lignina.	16
Figura 18: Arreglo espacial de la celulosa, hemicelulosa y lignina de la biomasa lignocelulósica.	17
Figura 19: Agave tequilana Weber.	18
Figura 20: Esquema simplificado de las cuatro etapas del proceso de producción de bioetanol.	19
Figura 21: Hidrólisis enzimática de la celulosa.	21
Figura 22: Enlaces susceptibles de hidrólisis enzimática en la hemicelulosa.	22
Figura 23: Principales derivados que resultan de algún pretratamiento lignocelulósico.	25
Figura 24: Extrusor de doble tornillo.	28
Figura 25: Representación esquemática de la configuración del extrusor de doble tornillo.	31
Figura 26: Extrudado (1), extrudado seco (2) y triturador (3) del bagazo de agave.	33
Figura 27: Compuestos inhibitorios utilizados para las curvas de calibración.	37
Figura 28: Cambio de masa en el tiempo en función del cambio de presión parcial.	39
Figura 29: Isoterma de absorción y desorción de la muestra sin tratamiento.	39
Figura 30: Mecanismo propuesto del incremento de la sacarificación enzimática por el pretratamiento. ...	104
Figura 31: Picos característicos de difracción de rayos X de la celulosa tipo I (izquierda) y tipo II (derecha). 105	
Figura 32: Espectro de difracción de rayos X de la celulosa amorfa y cristalina.	105
Figura 33: Patrón de difracciones de rayos x de la celulosa, hemicelulosa y lignina.	106
Figura 34: Espectros FTIR de la madera de abeto y sus componentes lignocelulósicos.	108
Figura 35: Análisis de componentes principales (PCA).	110

ÍNDICE DE GRÁFICAS DE RESULTADOS

Gráfica de resultados 1: Espectro de difracción de rayos X de las muestras del grupo A.	43
Gráfica de resultados 2: Espectro de difracción de rayos X de las muestras del grupo B.	44
Gráfica de resultados 3: Espectro de difracción de rayos X de las muestras del grupo C.	45
Gráfica de resultados 4: Difractogramas de los principales tratamientos realizados en el extrusor.	46

Gráfica de resultados 5: Índice de cristalinidad de las diferentes muestras.....	47
Gráfica de resultados 6: Área de los difractogramas.	51
Gráfica de resultados 7: Suma de la intensidad de los picos $2\theta = \sim 14.9^\circ, \sim 15.2^\circ, \sim 24.3^\circ, \sim 30.0^\circ$ y $\sim 38.1^\circ$	52
Gráfica de resultados 8: Desplazamiento del pico principal $2\theta = 22.5^\circ$ característico de la celulosa tipo I.....	54
Gráfica de resultados 9: ACP de las muestras, los rendimientos y los principales resultados de los difractogramas.	55
Gráfica de resultados 10: ACP de las muestras a través de la totalidad de los datos de DRX.....	57
Gráfica de resultados 11: Espectro de infrarrojo por transformada de Fourier de las muestras del grupo A.	59
Gráfica de resultados 12: Espectro de infrarrojo por transformada de Fourier de las muestras del grupo B.	60
Gráfica de resultados 13: Espectro de infrarrojo por transformada de Fourier de las muestras del grupo C.	61
Gráfica de resultados 14: ACP entre las diferentes muestras y la intensidad de sus principales picos característicos de los espectros de FTIR.	73
Gráfica de resultados 15: ACP entre las diferentes muestras a través de la totalidad de las absorbancias en los espectros de FTIR.	74
Gráfica de resultados 16: Cromatograma del HPLC de la muestra sin tratamiento y sus resultados.	76
Gráfica de resultados 17: Concentración de HMF en el grupo B (mg/L).....	78
Gráfica de resultados 18: Concentración de HMF en el grupo C (mg/L).....	78
Gráfica de resultados 19: Concentración de HMF del grupo A, únicamente de los DTR (mg/L).	79
Gráfica de resultados 20: Concentración de ácidos fenil propanoico de muestras DTR y el control (mg/L). ..	80
Gráfica de resultados 21: Concentración de ácidos fenil propanoicos de muestras del grupo B (mg/L).....	80
Gráfica de resultados 22: Concentración de ácidos fenil propanoicos de muestras del grupo C (mg/L).	81
Gráfica de resultados 23: Concentración de ácido 3-4 dihidroxibenzoico (mg/L).	82
Gráfica de resultados 24: Concentraciones de ácido benzoico y fenol en todas las muestras (mg/L).....	83
Gráfica de resultados 25: Suma total de los principales inhibidores en el grupo A, B y el control (mg/L).....	85
Gráfica de resultados 26: Suma total de los principales inhibidores en los filtrados y el control (mg/L).	86
Gráfica de resultados 27: Isotermas de adsorción y desorción de agua en las muestras.....	87
Gráfica de resultados 28: Isotermas de desorción de agua en las muestras.	87
Gráfica de resultados 29: Isotermas de adsorción y desorción del bagazo de agave con pretratamiento y sin pretratamiento.	88
Gráfica de resultados 30: Cambio estructural variando la temperatura a concentración de sosa constante. 89	
Gráfica de resultados 31: Cambio estructural variando la concentración de sosa a temperatura constante. 90	
Gráfica de resultados 32: Isotermas de desorción de muestras filtradas.	91
Gráfica de resultados 33: Isotermas de desorción de muestras a diferentes procedimientos de pretratamiento con condiciones de concentración de sosa y temperatura similares.	91
Gráfica de resultados 34: ACP de todas las variables.	93

RESUMEN

El presente estudio consistió en caracterizar diferentes muestras de bagazo de agave de segunda generación que resultaron de una nueva forma de pretratamiento alcalino-termofísico por medio de un extrusor a distintas condiciones de tratamiento: variaciones en la concentración de sosa, temperatura, doble tiempo de residencia e implementación de un filtro. Para la caracterización de los extrudados se utilizaron técnicas de cromatografía líquida de alto desempeño, sorción dinámica de vapor, difracción de rayos X y espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, con los que se determinó el índice de cristalinidad, cambios en los grupos funcionales, la determinación y concentración de compuestos inhibidores, el volumen de poro, el área superficial y el potencial de sacarificación.

De los resultados de caracterización, se buscó determinar la composición y la estructura que promueven un incremento en el potencial de sacarificación, de los que se identificaron principalmente tres: el incremento en el área superficial, la amplificación del volumen de poro y la eliminación de compuestos inhibidores. Así mismo, las condiciones de tratamiento que intensificaron el rendimiento enzimático son: concentraciones de sosa de entre tres y cinco por ciento, con temperaturas de entre ciento treinta y ciento cincuenta grados centígrados, efectuar un doble tiempo de residencia e implementar la filtración. Por otro lado, a través del análisis de componentes principales de los difractogramas y los espectros de las diferentes muestras se logró identificar y clasificar fácilmente aquellas muestras que contienen el potencial para conseguir los mejores rendimientos hidrolíticos.

En conclusión, esta investigación se realizó con el objetivo de entender los efectos que producen diferentes tratamientos en el extrusor al bagazo de agave. Pero más allá de comprender y mejorar el proceso de extrusión para la producción de bioetanol, la motivación principal es tratar de implementar y optimizar nuevas metodologías que desarrollen combustibles renovables, baratas y amigables al medio ambiente.

1. INTRODUCCIÓN

Es importante que aprendamos a abrir los ojos y sensibilizarnos sobre los problemas de la actualidad, no solo para conocerlos, sino para saber sus causas, además de cultivar la prevención y la búsqueda de una solución a estos problemas. Por lo tanto, es esencial informarse del continuo crecimiento demográfico, la escasez energética y la contaminación ambiental que se vive hoy en el mundo y en México, para así averiguar estrategias en conjunto y emprender acciones a los retos que nos desafían.

1.1 PANORAMA MUNDIAL DEMOGRÁFICO, ENERGÉTICO Y AMBIENTAL

Actualmente, la situación demográfica mundial se encuentra con una población de 7.4 billones, con un proceso acelerado de urbanización en el que se añade una ciudad del tamaño de Shanghai cada cuatro meses a la población urbana mundial y un pronóstico de más 9 billones para el año 2040.

La situación energética mundial mantiene a Estados Unidos, país con la mayor economía del mundo, sacudiendo el orden establecido en los mercados, a través de ser este un importante exportador de petróleo y gas, provocando que Medio Oriente se esté convirtiendo rápidamente en su principal consumidor. Por otra parte China, con la segunda economía más grande del mundo, ha comenzado a influir las tendencias, impulsando tecnologías de energía alternativa, en las que inclusive Shell, una de las petroleras más importantes del mundo, anunció una inversión de 100,000 millones de dólares para la producción de energía limpia (Health Effects Institute, 2017).

Las fuentes de energía renovable han ido aumentando y en el 2005 estas lograron suministrar el 13.4% de los 13,647 Mtoe de energía primaria total en el mundo (**Figura 1**). La contribución de las principales fuentes de energía limpia lo encabezan los biocombustibles más desperdicios con 70.6% y que incluye a los biocombustibles líquidos con un porcentaje del 4.3%, seguido de la hidroelectricidad con 18.3%, en tercer lugar se

encuentra la eólica con 4.0%, continuando con la geotérmica con 4.1% y finalmente la solar más mareomotriz con 3.0% (**Figura 1**).

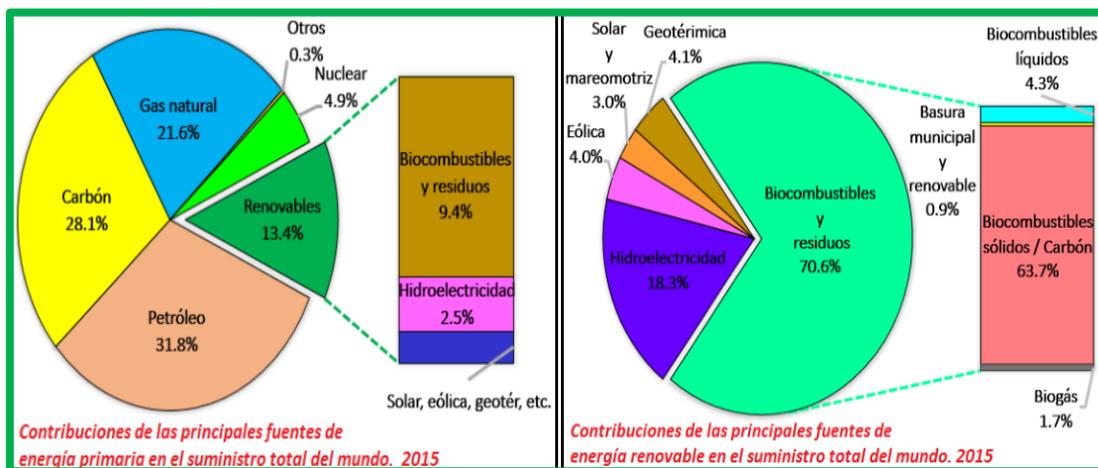


Figura 1: Suministro mundial de energía primaria (derecha) y de energías renovables (izquierda).
(International Energy Agency, 2017)

La demanda energética mundial aumenta un poco más lento que en el pasado (**Figura 2**), sin embargo se estima que para el 2040, esta demanda se incremente un 30%, equivalente a la de agregar otra China e India a la demanda energética actual. Las fuentes de energías renovables y de gas natural tendrán un papel importante en el abastecimiento energético en el futuro, ya que se pronostica que serán estas fuentes las que tendrán la mayor tasa de crecimiento (International Energy Agency, 2017).

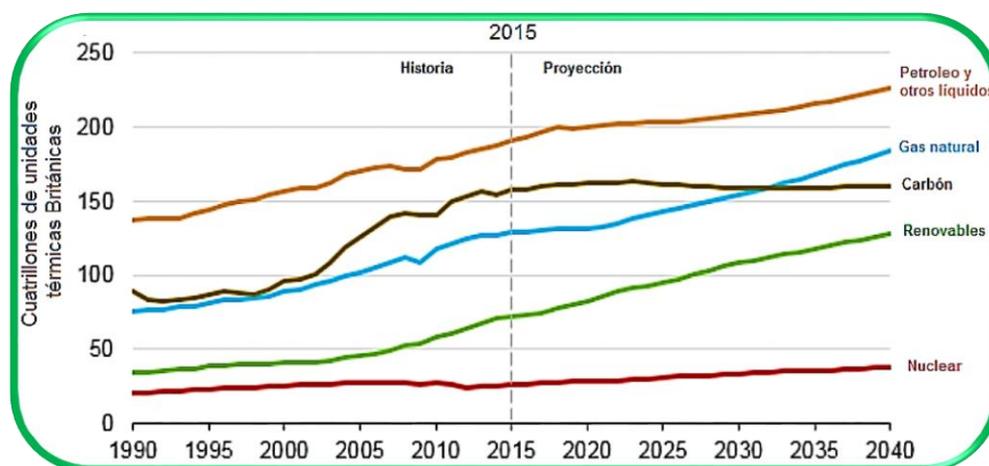


Figura 2: Historia y pronóstico de la demanda de energía mundial por fuente (1990-2040).
(International Energy Agency, 2017)

La situación ambiental en el año 2015 estaba con más del 90% de la población mundial viviendo en áreas con aire insalubre. La contaminación del aire es una mezcla compleja de gases y partículas cuyas fuentes y composiciones varían en el espacio y el tiempo. Los indicadores más ampliamente monitoreados en todo el mundo son: PM_{2.5} (partículas suspendidas en el aire con un diámetro aerodinámico menor o igual a 2.5 micrómetros), el dióxido de carbono y el ozono.

En un análisis en el año 2015 del indicador PM_{2.5} se diagnosticaron concentraciones globales de 44.2 µg/m³ con un aumento del 11.2% desde 1990 y se le adjudicó como el quinto factor de riesgo de muerte apoderándose de la vida de 4.2 millones de personas. Las concentraciones más altas de PM_{2.5}, relacionadas con las fuentes de combustión, fueron en el sur de Asia, China, África central y occidental (**Figura 3**) (Health Effects Institute, 2017).

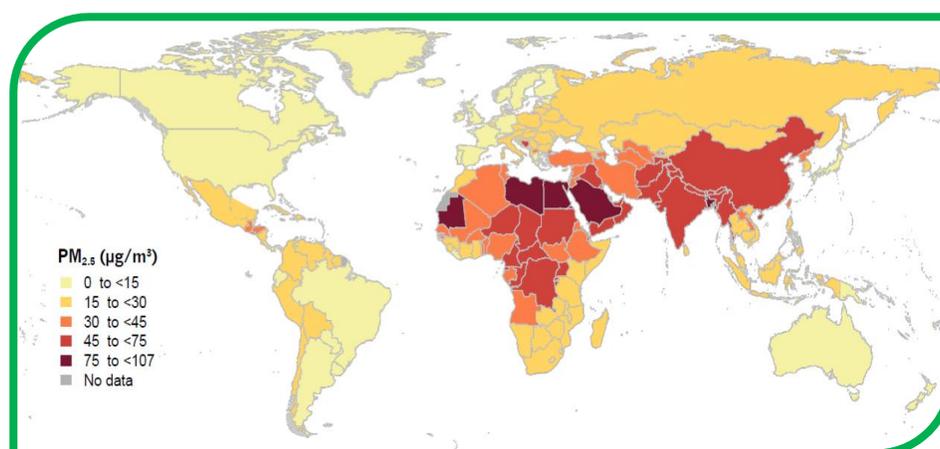


Figura 3: Concentraciones promedio anuales de PM_{2.5} ponderadas por población en 2015. (Health Effects Institute, 2017)

El dióxido de carbono (CO₂), segundo indicador de contaminación ambiental, es un gas de efecto invernadero que se libera por actividades humanas como la deforestación, la quema de combustibles fósiles y procesos naturales como la respiración o las erupciones volcánicas. Las concentraciones de CO₂, en la atmósfera y el aire, han alcanzado niveles records con 400 ppm en el 2013 y se estima un incremento de más de 2 ppm al año, con probabilidades de alcanzar 500 ppm en los próximos 45 años. Este gas, no daña directamente la salud humana, pero debido a que fomenta el calentamiento global,

promueve efectos potencialmente peligrosos que incluyen miles de muertes por olas de calor, eventos climáticos extremos y propagación de enfermedades transmitidas por garrapatas y mosquitos (Loria, 2018). En la **Figura 4** se observa una clara relación entre el incremento de las concentraciones atmosféricas de CO₂ con en las anomalías térmicas de la temperatura media global.

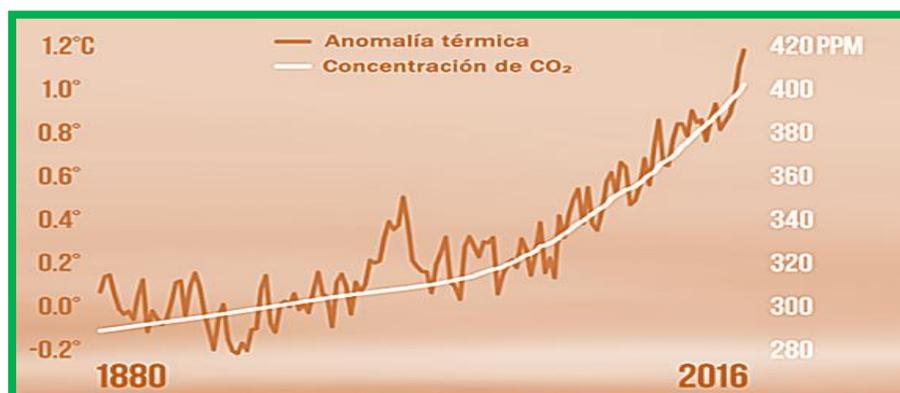


Figura 4: Correlación del incremento de la temperatura media global y los niveles de CO₂, 1880 a 2016.

El tercer indicador de contaminación ambiental es el ozono, un gas incoloro muy reactivo, que se forma a través de precursores como los óxidos de nitrógeno especialmente en las latitudes medias con temperaturas cálidas y economías en desarrollo (**Figura 5**). De 1990 a 2015, las concentraciones de ozono aumentaron un 7% a nivel mundial y fueron responsables de unas 254,000 muertes en el año 2015. Algunos de los países con mayores incrementos de este gas son China, India y Brasil (Health Effects Institute, 2017).

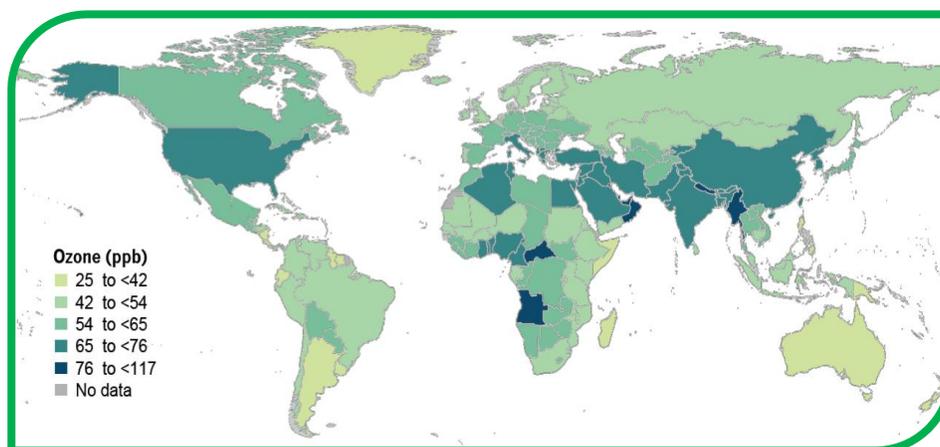


Figura 5: Concentraciones de ozono ponderadas por población promedio estacional en 2015.
(Health Effects Institute, 2017)

El cambio climático, continúa siendo el principal desafío en la situación ambiental. Por esta razón, los políticos deben tener un conocimiento más profundo de los principales sectores **(Figura 6)** y los principales componentes que contribuyen al efecto invernadero como son el vapor de agua, el bióxido de carbono, el metano, el óxido nitroso, el ozono, entre otros y de ahí que se tomen medidas para evitar un peligro inminente.

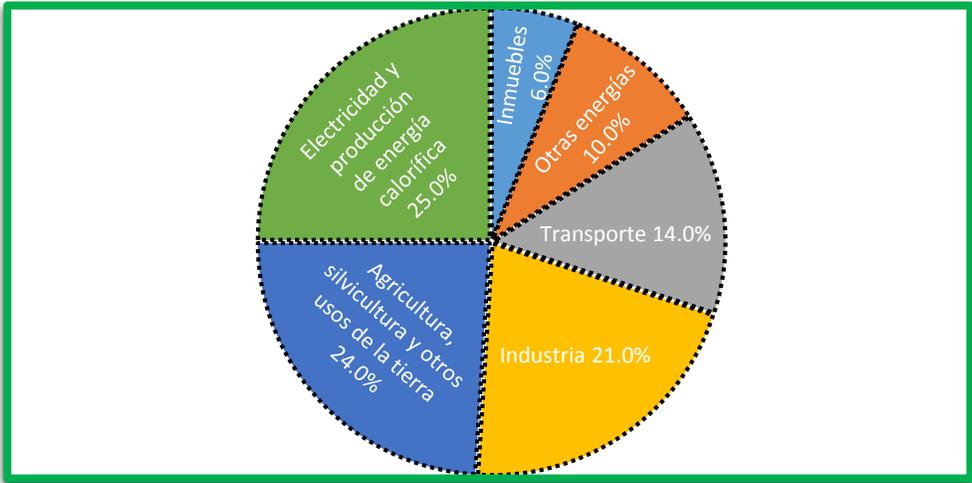


Figura 6: Principales sectores que expulsan emisiones de gases de efecto invernadero globales, 2010.
(United States Environmental Protection Agency, 2017)

1.2 PANORAMA NACIONAL DEMOGRÁFICO, ENERGÉTICO Y AMBIENTAL

México cuenta con una superficie de aproximadamente dos millones de kilómetros cuadrados, una población de 124.7 millones de habitantes y un crecimiento promedio anual de 2.5%. Se estima que para el año 2050 la población mexicana crezca a 155.4 millones de personas, según reportes de INEGI y la CONAPO en un censo del 2017. Este país se ubica en el puesto quince de las mayores economías del mundo y la segunda de América Latina (Fondo Monetario Internacional et al., 2015). Durante el año 2016 la producción de energía primaria disminuyó 6.6% respecto al año 2015 con 7,714.23 petajoules y es el petróleo, el energético primario con la mayor producción en el territorio nacional (**Figura 7**).

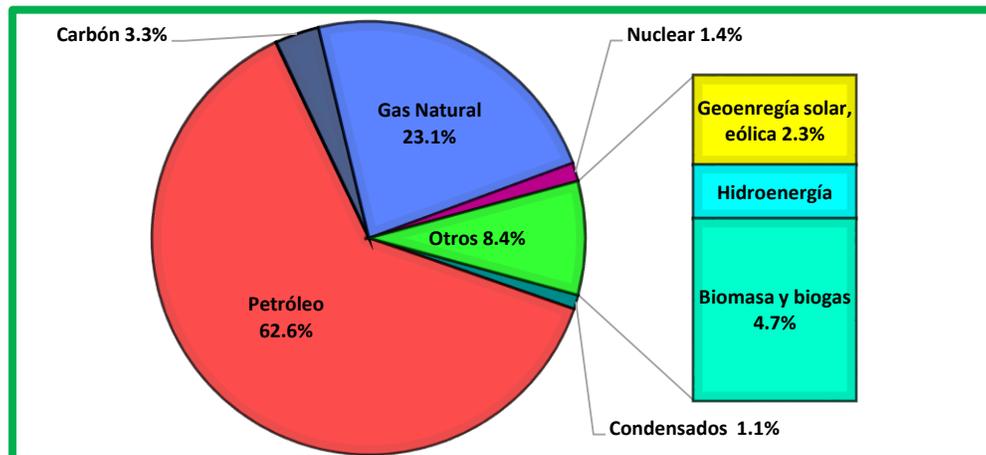


Figura 7: Estructura de la producción de energía primaria en México, 2016.
(SENER, 2017)

En los últimos diez años la producción de petróleo crudo ha enfrentado una tasa de crecimiento negativo de -3.8%. A inicios del 2018, las reservas probadas de hidrocarburos de México bajaron un 7.4% con respecto al año anterior para ubicarse en 8,483 millones de barriles de petróleo crudo equivalente. Al ritmo actual de extracción nuestras reservas probadas equivalen a 12 años de producción y nuestras reservas totales equivalen a 30 años de producción (PEMEX, 2017). Por otro lado, las principales fuentes de energía renovable que existen en México son la eólica y la solar (**Figura 8**). Sin embargo, a pesar del discurso “verde” que recorre el mundo, México seguirá siendo un país cuya producción de energía recae mayoritariamente en los hidrocarburos, principalmente de petróleo y gas natural.

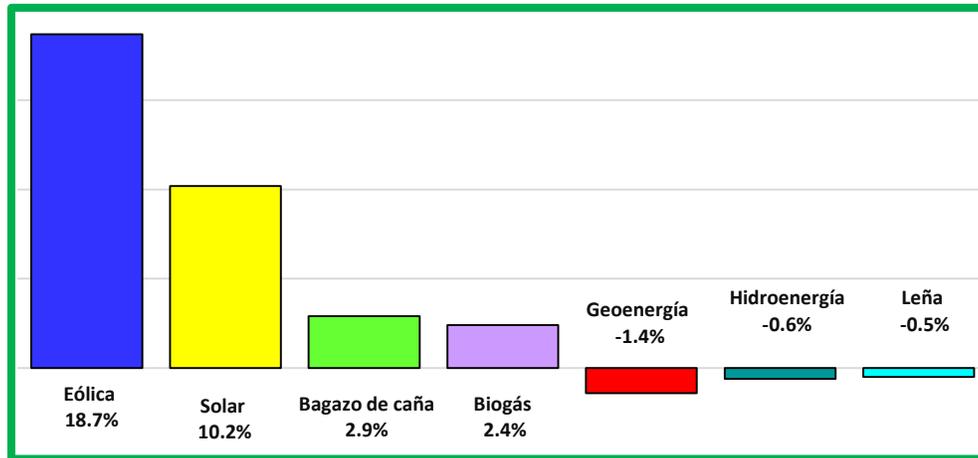


Figura 8: Porcentaje de fuentes renovables que incrementaron y disminuyeron en México, 2016. (SENER, 2017)

La situación ambiental en México según el Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) que evaluó la concentración de partículas finas $PM_{2.5}$ en 2010, encontró que la mala calidad de aire provocó pérdidas económicas por 45 mil millones de pesos y 2,170 de muertes prematuras. A nivel nacional en el año 2008, se emitieron alrededor de 59 millones de toneladas de contaminantes. Del total de contaminantes, el 21% fue de fuentes naturales y el 79% fue de fuentes antropogénicas, de esta última sus principales compuestos tóxicos fueron el monóxido de carbono (CO), los compuestos orgánicos volátiles (COV), los óxidos de nitrógeno (NO_x) y el bióxido de azufre (SO_2) y su proporción se observa en la **Figura 9** (SEMARNART, 2015).

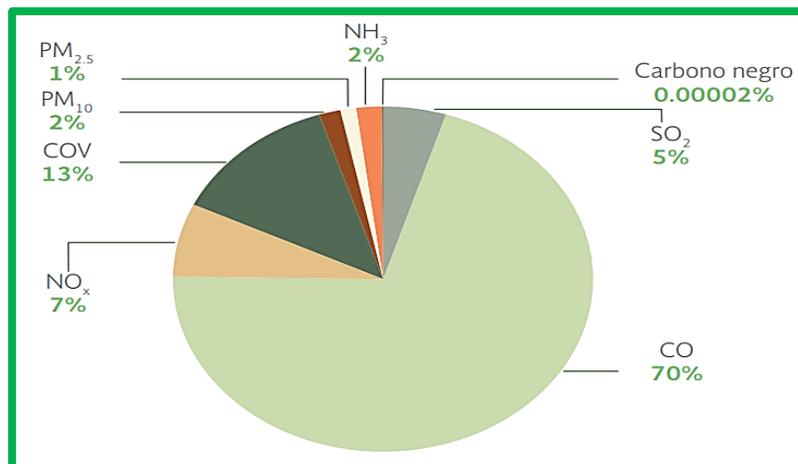


Figura 9: Emisión nacional de contaminantes de origen antropogénico por contaminante, 2008. (SEMARNART, 2015)

El transporte es la principal fuente de gases de efecto invernadero, el autotransporte constituye 90% del consumo total de energía, además de ser la primera fuente de contaminantes que dañan la salud y la calidad de vida. Para 2012, México contaba con una flota de 26 millones de vehículos privados, incrementándose un 6.4% al año, esto quiere decir que para 2030 habrá alrededor de 70 millones de coches privados (ExpokNews, 2013). La **Figura 10** muestra los diferentes sectores que contribuyen a la contaminación en México.

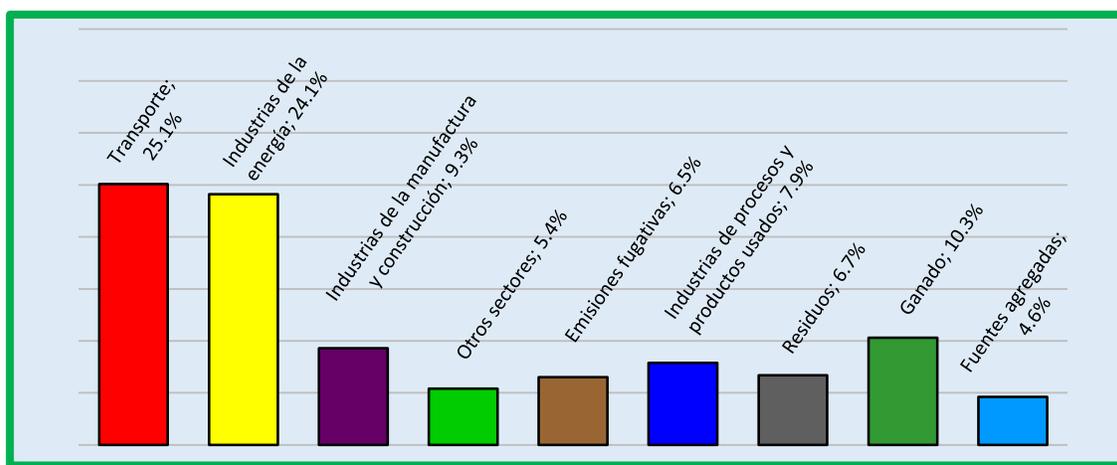


Figura 10: Sectores que contribuyen a la contaminación en México, 2015.
(SEMARNART, 2015)

Uno de efectos más graves relacionado con la contaminación es el aumento de la temperatura. En el 2015 se obtuvo 1.1 °C por arriba del periodo 1981-2010 en la temperatura media, convirtiéndose junto con el 2014 como los años más cálidos desde 1971. (SEMARNART, 2015). No sólo el incremento de temperatura es alarmante, el aumento del nivel del mar y los climas extremos como ciclones, sequias, lluvias torrenciales, ondas de calor, entre otros se han acentuado. Es por esto, que los políticos mexicanos deben de tener como prioridad en su agenda el cambio climático y nuevas estrategias que reviertan esta situación antes de que sea demasiado tarde.

Una estrategia para revertir el cambio climático es a través de los desechos agroindustriales, que incluyen residuos orgánicos urbanos, desechos de industrias alimenticias, restos agrícolas o forestales, entre otros y que son una de las principales fuentes de contaminación

de suelo y agua que provoca la proliferación de fauna nociva (Yusuf, 2017). En México, en particular nos interesan los desechos tequileros, principalmente el bagazo de agave (**Figura 11**), ya que en el 2018 se produjo 290 millones de litros de tequila que generaron aproximadamente 493 mil toneladas de bagazo con 2,900 millones de litros de vinazas, pero sobretodo porque tienen un alto potencial en la industria energética como fuente alternativa y renovable para la producción de combustible carburante (Casa Sauza , 2017).

El bagazo de agave (**Figura 11**), fibra que si bien es biodegradable, puede pasar hasta un año para que de manera natural se descomponga, tiene la posibilidad de transformarse en un combustible renovable o biocombustible. Así mismo, este nuevo producto con valor agregado favorecería; la situación ambiental, al reducir la contaminación y frenar el uso de productos fósiles; la situación energética, al contribuir con el suministro de energía primaria y la situación demográfica, al satisfacer parte de la demanda energética con el continuo crecimiento poblacional.



Figura 11: Residuo de bagazo de agave.
(Ciencia y desarrollo , 2014)

2. MARCO TEÓRICO

2.1 DEFINICIÓN DE BIOMASA

La biomasa es un grupo de productos energéticos de tipo renovable incluyendo residuos y desechos orgánicos que se origina a través de la fotosíntesis de los vegetales y que son susceptibles a ser aprovechados energéticamente (Garrido, 2012).

2.2 DEFINICIÓN DE BIOCOMBUSTIBLE

Los biocombustibles son recursos energéticos procesados por el ser humano a partir de la biomasa, estos existen en varios estados de agregación como: líquidos, sólidos o gaseosos y su finalidad última es liberar la energía contenida en sus componentes químicos mediante una reacción de combustión. (Maciel, 2009)

2.3 CLASIFICACIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Existe un sistema que clasifica los biocombustibles para conocer el tipo de insumo y la tecnología que se emplea para su producción. Esta clasificación cuenta hasta la fecha con cuatro generaciones y que a continuación se describen (**Figura 12**).

Primera generación: Los insumos son de procedencia agrícola, con alto contenido de almidón, azúcares y aceites, algunos ejemplos son la caña de azúcar, maíz, diversos aceites como el aceite de girasol o de coco, entre otros.

- **Ventajas:** Su facilidad de procesamiento, utilizando tecnología convencional como fermentación, trans-esterificación y digestión anaerobia para la producción de alcoholes, biodiesel y biogás respectivamente. Además, las emisiones de gases de efecto invernadero en su producción son bajas o nulas.

- Desventaja: El desvío de los recursos alimenticios o cultivos hacia la producción de energéticos, lo que resulta en el aumento de precios como la tortilla o el azúcar.

Segunda generación: Los insumos son residuos agrícolas o forestales, compuestos por celulosa como la paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, hojas, ramas secas, desperdicios municipales, entre otros y se fabrica alcoholes, gas de síntesis, biodiesel, 2.5-dimetilfurano, entre otros.

- Ventajas: Principalmente la inexistente desviación de alimentos provenientes de la agricultura hacia el sector energético. No requiere de terrenos ni fertilizantes para su producción. Disminuyen la contaminación de suelos debido al uso de desechos. Gran cantidad de materia prima disponible.

- Desventajas: Procesos de producción más complejos y costosos. Transporte del insumo a la planta de fabricación del biocombustible. Poca ganancia en la disminución de las emisiones de gases de efecto invernadero durante el procesamiento de los insumos. Se considera la existencia de otras tecnologías más “prometedoras” que elimine el motor de combustión.

Tercera generación: Los insumos son vegetales no alimenticios de crecimiento rápido y alta densidad energética denominados como cultivos energéticos. Algunos de estos insumos son los pastos perennes, plantas de crecimiento rápido, algas verdes y verde-azules.

- Ventajas: Absorción de CO₂ para la producción de los insumos con un balance positivo en la emisión de gases de efecto invernadero. No hay conflicto entre alimento-energía.
- Desventajas: La recolección de algas es costosa y complicada. No hay regulación. Insuficiente biomasa para su comercialización. Se requieren grandes fuentes de carbono y nitrógeno.

Cuarta generación: Se producen a partir de biomasa de micro algas genéticamente modificadas, con alta eficiencia fotosintética y adaptabilidad ambiental, que conlleva a aumentos significativos en el contenido de lípidos o carbohidratos.

- **Ventajas:** No hay conflicto entre alimento-energía. Fácil conversión debido al aumento de la hidrólisis y/o la eficiencia de la fermentación. Se puede utilizar tierras no cultivables, aguas residuales, salinas y no potables. Fijación de CO₂ y tratamiento de aguas. Los nutrientes pueden ser reciclados en el proceso.
- **Desventajas:** Insuficiente biomasa para la comercialización. Riesgos ambientales y ecológicos por la filtración de estos organismos. Se requieren grandes fuentes de carbono y nitrógeno. La energía solar solo está disponible durante el día. La recolección de micro algas es costosa y complicada (Bawadi, et al., 2019).



Figura 12: Generaciones de biocombustibles.

2.4 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA DE SEGUNDA GENERACIÓN

La biomasa lignocelulósica es un material sintetizado por células vegetales, que está compuesta principalmente de una mezcla de polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa), un polímero polifenólico aromático (lignina) y en menor porción de pectinas, compuestos inorgánicos, proteínas, ceras y lípidos. La composición específica de la lignocelulosa depende de la especie y las condiciones de crecimiento de la planta. Esta biomasa es la más abundante en el mundo con 200,000 millones de toneladas y puede provenir de diversas fuentes: residuos de industrias alimentarias, agrícolas, forestales, municipales, entre otras (Brandt, et al., 2013).

2.4-1. Celulosa

La celulosa es el componente de mayor proporción en la lignocelulosa con un porcentaje entre 35% y 50% en peso, es insoluble en agua, propiedad necesaria para que funcione como el soporte estructural en las paredes celulares de las plantas. La celulosa está constituida por unidades D-anhidroglucopirinosas unidas por enlaces glucosídicos β -(1 \rightarrow 4) que dan lugar a una conformación de cadena lineal con enlaces de hidrógeno en forma cruzada que unen estas cadenas en forma de láminas (**Figura 13**).

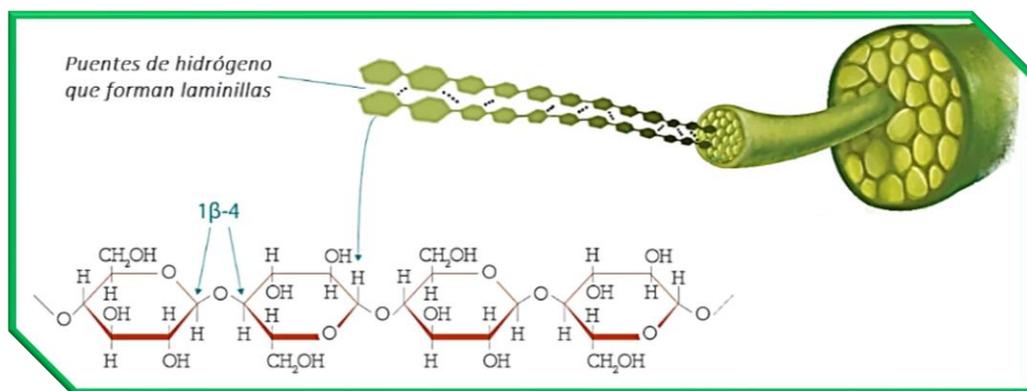


Figura 13: Cadenas de láminas planas de celulosa.
(Portal académico CCH, 2017)

Tomando a la celobiosa como unidad básica (**Figura 14**), la celulosa se puede considerar como un polímero isotáctico (unidades repetitivas constantes) de celobiosa y llega a contener más de 10,000 unidades de glucosa (Brandt, et al., 2013). El anillo de piranosa, los enlaces glucosídicos y los grupos (-CH₂OH) y (-OH), están en posición ecuatorial con respecto al plano medio del anillo y los átomos de hidrógeno en posición axial (Huerta, 2011).

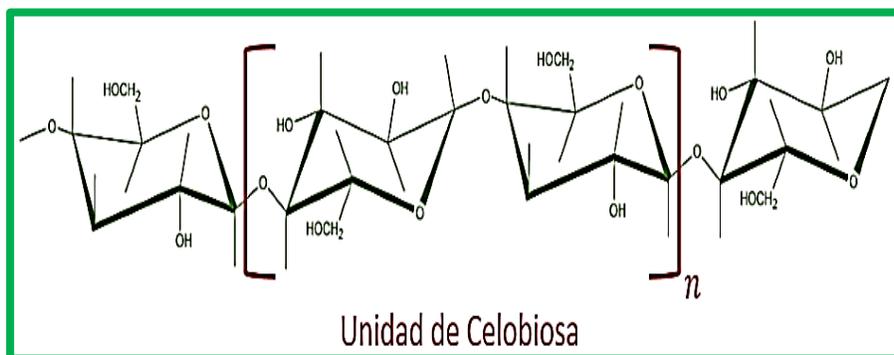


Figura 14: Estructura química de la unidad de celobiosa.
(Huerta, 2011)

2.4-2. Hemicelulosa

La hemicelulosa constituye alrededor del 25% en peso de la lignocelulosa y consiste en un grupo de heteropolisacáridos como: pentosas (D-xilosa y L-arabinosa), hexosas (D-glucosa, D-manosa, D-galactosa) y ácidos azucarados (ácido D-glucurónico, ácido 4-O-metil-D-glucurónico, ácido D-galactourónico (**Figura 15**).

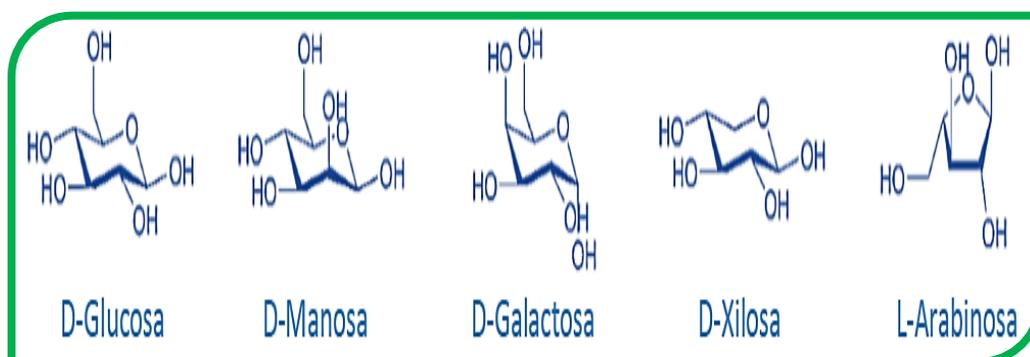


Figura 15: Hexosas y pentosas típicamente encontradas en la hemicelulosa.
(Brandt, et al., 2013)

La hemicelulosa (**Figura 16**) contiene una cadena principal de pentosas y hexosas, por ejemplo, xilano o glucomanano y es ramificada con grupos acetilos, metilos, ácidos cinámicos, glucurónicos, galacturónicos, etc. Este polisacárido sirve de cohesión entre la lignina y las fibras de celulosa, se cree que están involucradas en la elongación, en la estabilidad estructural y modificación de la pared vegetal. La adhesión entre la celulosa y la hemicelulosa se dan por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (González, 2011).

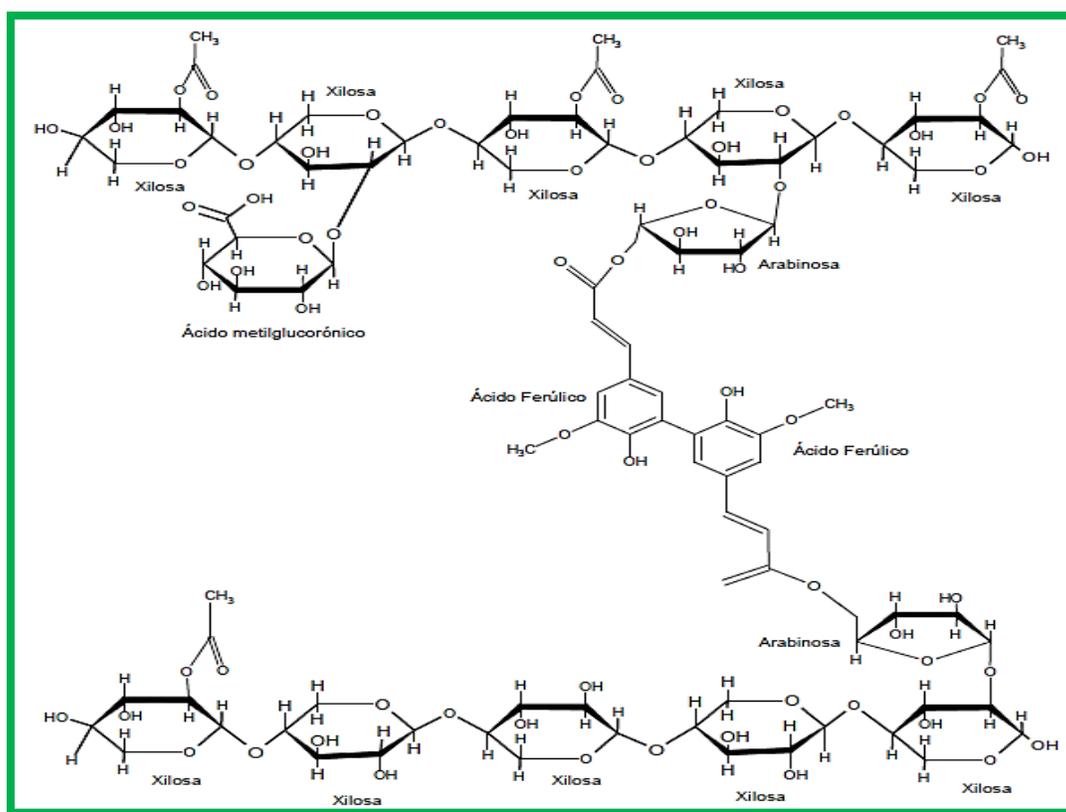


Figura 16: Estructura de la hemicelulosa.
(González, 2011)

2.4-3. Lignina

La lignina es un heteropolímero aromático, insoluble en agua y poco reactivo, que proporciona impermeabilidad, refuerzo estructural, resistencia al ataque biológico y físico del medio ambiente. Se biosintetiza a partir tres monómeros fenil-propano: alcoholes coniferílico, alcohol sinapílico y alcohol p-comarílico (**Figura 17**). Una vez incorporadas en el

polímero de la lignina, las subunidades se identifican por su estructura de anillo aromático y se denominan subunidades de guayacilo, siringilo y p-hidroxifenilo, respectivamente (Brandt, et al., 2013).

El principal constituyente de la lignina en la madera blanda es casi exclusivamente de subunidades guayacilo (G), mientras que en la madera dura y herbáceos son mezclas de subunidades hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S). Se ha demostrado que las subunidades (S) son más susceptibles a la degradación hidrotérmica que las subunidades (G). El enlace éter β -O-4 es el más común en este heteropolímero aromático, seguido de los enlaces C-O y C-C que están presentes pero en menor abundancia. La composición y configuración de la lignina es uno de los principales obstáculos en la eficiencia del proceso de deconstrucción de la biomasa, ya que impide el acceso de las hidrolasas además de inhibir su acción (Pan, 2008).

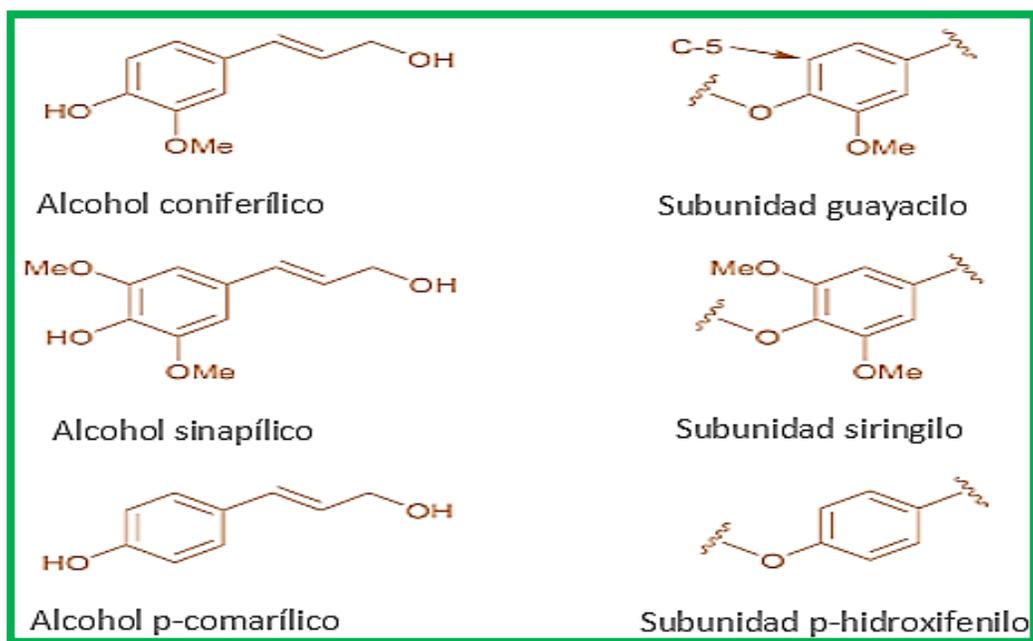


Figura 17: Las tres unidades base fenil propano y sus subunidades que conforman la lignina. (Brandt, et al., 2013)

La mayoría de las células vegetales, que determinan la forma en que sintetizan sus paredes, desaparecen al alcanzar la madurez, lo que resulta y permite que la estructura permanezca

por mucho más tiempo en un material poroso y liviano. Debido a la gran diversidad vegetal en la biomasa, la organización lignocelulósica varía en composición, espesor y porosidad, es por esto, que el método de deconstrucción también cambia entre las especies vegetales y hasta entre la misma especie (**Figura 18**). De la estructura lignocelulósica, la hemicelulosa es térmicamente más sensible, ya que partes de ella se empiezan a solubilizar en condiciones neutras desde los 150°C.

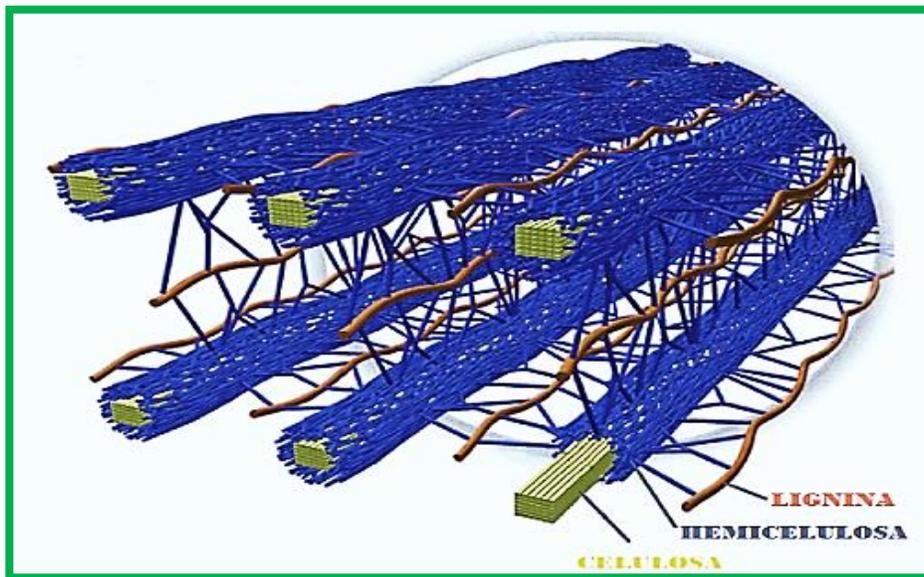


Figura 18: Arreglo espacial de la celulosa, hemicelulosa y lignina de la biomasa lignocelulósica.
(Brandt, et al., 2013)

2.5 AGAVE

Agave es un género con unas 200 a 300 especies, que crece en climas semiáridos por lo que cuenta con una quinta parte de la superficie terrestre global para ser cultivada, principalmente en el norte de África, Australia, el sur de Estados Unidos y México, siendo este último país el que cuenta con mayor diversidad de especies. El cultivo de este género es bastante atractivo debido su elevada asimilación de CO₂, mínimo consumo de agua y nutrientes, gracias al metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM por sus siglas en inglés).

La especie *Agave tequilana* Weber variante *azul* se utiliza principalmente para la producción de tequila y solo puede usarse en las regiones que poseen la denominación de origen (Jalisco, Michoacán, Tamaulipas, Nayarit y Guanajuato). Esta especie se reconoce por sus hojas estrechas y rígidas de color azul, de casi dos metros de altura y una espina terminal. Se cultiva a una temperatura promedio de 22°C, con un mayor crecimiento durante octubre a marzo alcanzando su madurez hasta los diez años. No crece en regiones con temperaturas menores de -7°C, pero pueden tolerar hasta 55 °C.

El proceso de elaboración de tequila, después de al menos cinco años de cosecha, es utilizar la piña (tallo) para obtener mediante un proceso de cocción un jarabe rico en fructosa, que se fermenta para producir el tequila (**Figura 19**). Posteriormente, se obtiene un material sin aplicación importante, el bagazo, que se considera un residuo valioso con potencial para la producción de biocombustible de segunda generación (Davis, et al., 2011).



Figura 19: *Agave tequilana* Weber.

2.6 BIOETANOL COMO BIOCOMBUSTIBLE Y SU PROCESO DE PRODUCCIÓN

El bioetanol es el resultado de una serie de procedimientos químicos, físicos y biológicos que transforman la biomasa en moléculas de alcohol, cuya combustión es usada como combustible solo, mezclado con gasolina o como aditivo oxigenante. El proceso de producción de bioetanol consta de varias etapas (**Figura 20**), que se pueden modificar dependiendo de las características del material lignocelulósico y del tipo de tratamiento que se seleccionó. Sin embargo, el proceso estándar consta de cuatro principales pasos:

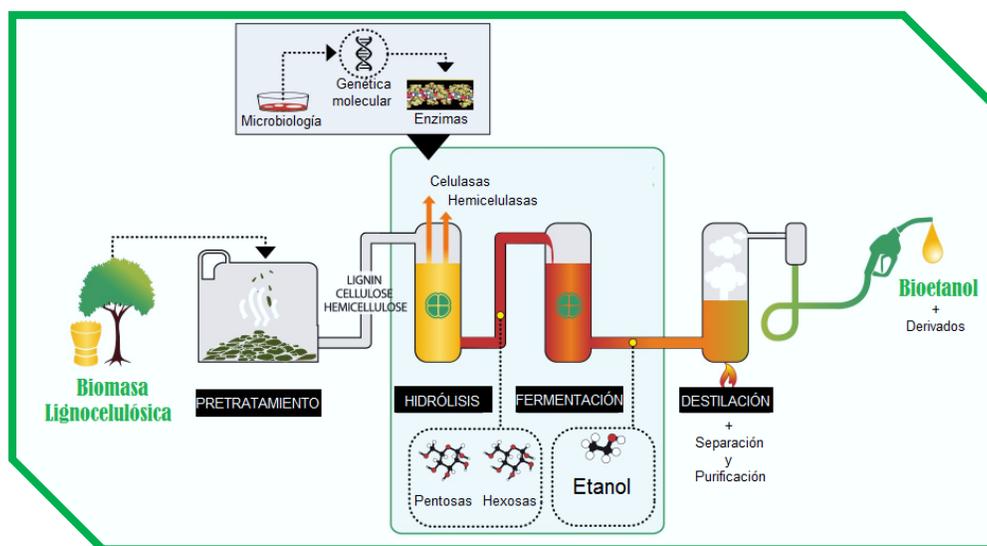


Figura 20: Esquema simplificado de las cuatro etapas del proceso de producción de bioetanol. (Technopow, 2018)

- **Pretratamiento:** Su principal función es incrementar la accesibilidad a la celulosa inmersa en la estructura compacta del material lignocelulósico, mediante procesos de destrucción mecánica, física o química. Esta etapa separa los principales biopolímeros o elimina la lignina que impiden la entrada de ácidos, bases o enzimas y así eleva los rendimientos hidrolíticos. Por otro lado, este paso si se realiza de manera efectiva permite disminuir el costo total del proceso, por lo que es el principal reto en el desarrollo de nuevas tecnologías para optimizar la conversión de la biomasa en azúcares fermentables y con ello minimizar los tiempos en la producción del bioetanol.

- **Hidrólisis:** Es el proceso que efectúa la liberación de azúcares simples, catalizada ya sea por ácidos o enzimas específicas, que atacan a los enlaces de la celulosa y la hemicelulosa.

La hidrólisis ácida ha sido la tecnología más usada para la obtención de azúcares fermentables. Consiste en transformar las cadenas de polisacáridos mediante una reacción secuencial en sus monómeros elementales. Se emplean catalizadores como el ácido sulfúrico o clorhídrico. Los principales inconvenientes de este proceso son: el rendimiento relativamente bajo y la alta formación de subproductos. El mecanismo consta de tres pasos:

1. Se forma un ácido conjugado mediante la adición de un protón al átomo de oxígeno que conecta dos unidades de azúcar.
2. El enlace glucosídico C-O se rompe y se forma un ion cíclico de carbonio, propagando la reacción. Este es el paso determinante.
3. Mediante una adición rápida de agua, este ion es transferido formando glucosa en el último paso de la reacción.

La otra forma de llevar a cabo la hidrólisis para generar azúcares reductores, involucra un coctel de enzimas con celulasas y xilanasas que degradan la celulosa y el xilano respectivamente. La acción hidrolítica catalizada por enzimas tiene muchas ventajas como: condiciones moderadas (pH de 5.0-5.5 y temperaturas de 45°C-50°C), altos rendimientos, costos de mantenimiento bajos comparados con la hidrólisis alcalina o ácida y no tiene problemas de corrosión.

El mecanismo de acción para la hidrólisis enzimática de la celulosa incluye la acción sinérgica de por lo menos tres tipos de celulasas (**Figura 21**)

1. Endoglucanasas: atacan regiones internas de baja cristalinidad de celulosa para transformar estas regiones en cadenas libres de celulosa.
2. Exoglucanasas o celobiohidrolasas: atacan los extremos libres de las cadenas libres de la celulosa generando unidades de celobiosa.
3. β -glucosidasas: transforman las unidades de celobiosa en moléculas de glucosa.

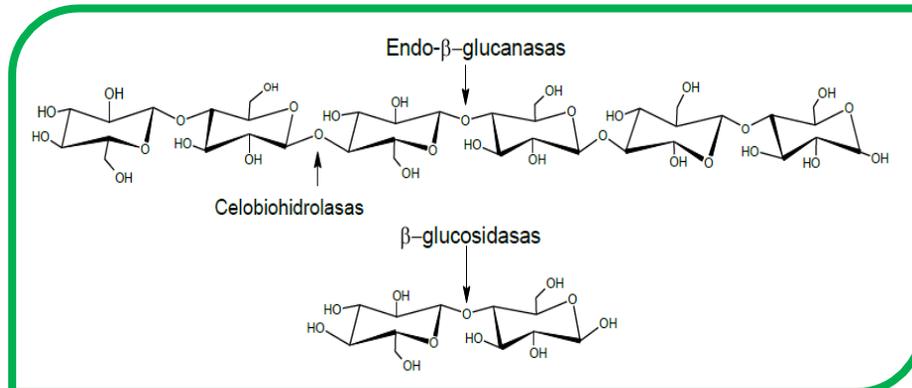


Figura 21: Hidrólisis enzimática de la celulosa.
(González, 2011)

El mecanismo de acción para la hidrólisis enzimática de la hemicelulosa requiere múltiples enzimas debido a su complejidad por su alta heterogeneidad y se clasifican en dos principales grupos las que actúan sobre la degradación del esqueleto de xilano y las que se encargan de remover las cadenas laterales (**Figura 22**)

Las principales enzimas que participan en la degradación y que realizan cortes en la parte interna del polímero de xilano son:

1. Endoxilanasas: ataca enlaces β -1,4 internos de la columna de xilano
2. Exoxilanas: ataca enlaces β -1,4 liberando xilobiosa
3. β -xilosidasa: libera xilosa de xilobiosa y xilooligosacáridos

La remoción de las cadenas laterales del xilano, es realizada por α -L-arabinofuranosidasas, α -D-glucuronidasas, acetil xilan esterasas, ácido ferúlico esterasas y ácido *p*-cumárico esterasas, entre otras (Tovar-Herrera, 2013).

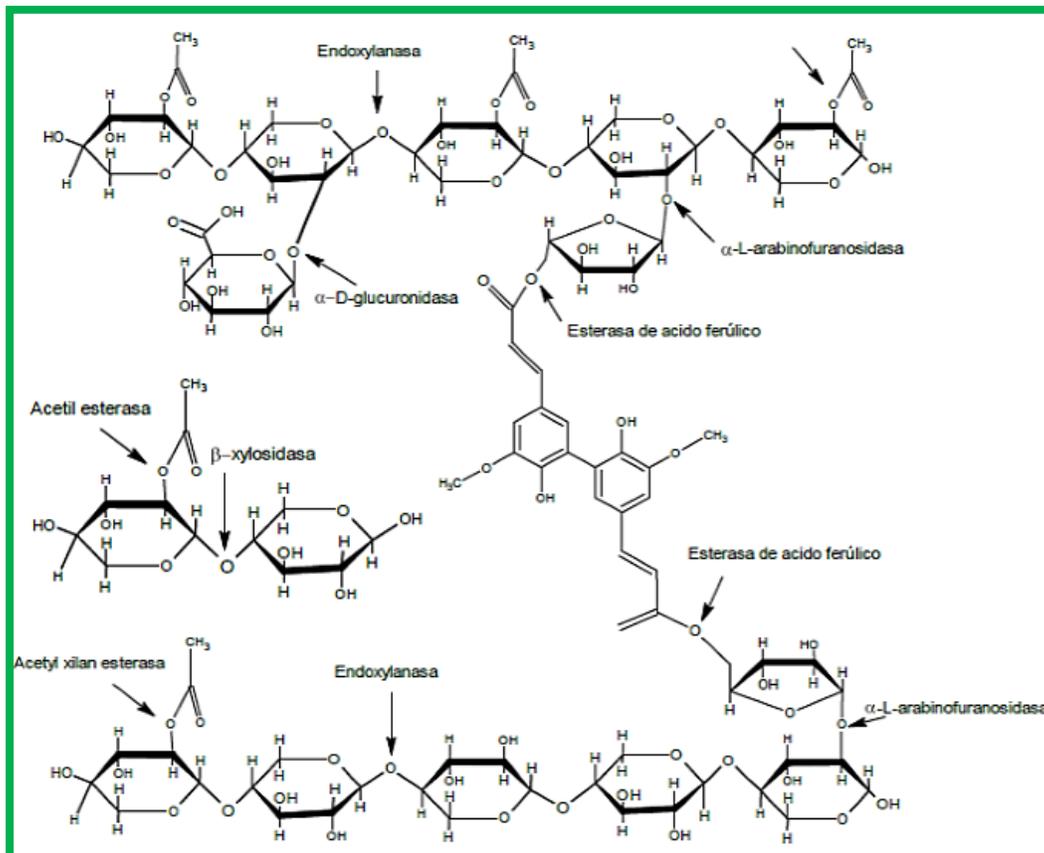


Figura 22: Enlaces susceptibles de hidrólisis enzimática en la hemicelulosa.
(Wyman, et al., 2005)

- Fermentación: Es un proceso catabólico de oxidación anaeróbica por medio de la ayuda de algún microorganismo, mismo que transforma la glucosa en etanol y CO₂ obteniendo con esto energía para llevar a cabo su metabolismo. Los microorganismos que pueden realizar esta transformación son generalmente bacterias y levaduras, industrialmente el más utilizado es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
- Destilación: Esta etapa consiste en la recuperación del bioetanol, generalmente hay subproductos como lignina residual, polisacáridos sin reaccionar, enzimas, microorganismos y otros productos que pueden ser removidos en los fondos por medio de la destilación. Estos materiales pueden ser convertidos en productos con valor agregado o simplemente pueden ser utilizados como materia energética que mantenga el proceso de forma que sea un sistema autosustentable.

2.6-1 Pretratamientos de material lignocelulósico

Diferentes tipos de pretratamientos han sido desarrollados para la transformación del material lignocelulósicos (**Tabla 1**), que genera una disminución del tiempo de hidrólisis y un incremento en el rendimiento. El objetivo de estos diferentes pre-tratamientos es reducir la cristalinidad de la celulosa, incrementar el acceso al remover la lignina o la hemicelulosa, aumentar el área superficial, aumentar la porosidad, eliminar productos inhibitorios, entre otros. La eficiencia depende del método que se utilice y el tipo de biomasa que se trate.

La selección de uno o varios tratamientos va en función de:

- Costo del proceso.
- Susceptibilidad a la hidrólisis enzimática.
- Efecto en la hemicelulosa y celulosa.
- Presencia de productos derivados que inhiban la actividad enzimática y la fermentación.
- Cantidad de consumo químico.
- Generación de productos tóxicos.
- Tiempo del proceso.

Tabla 1: Resumen de diferentes tipos de pretratamientos para materiales lignocelulósicos.
(Mamo, et al., 2013)

Pretratamiento	Método	Principio	Ventajas	Desventajas
Físico	Molienda mecánica	Fragmentación del material y reducción de tamaño de partícula	Aumento del área superficial y reducción del grado de polimerización	Poco efecto sobre la hidrólisis. Alto consumo de energía. Generación de inhibidores
	Irradiación Gamma	Irradiación de energía generando ruptura de enlaces	Eficiente en presencia de lignina	Costosa y no factible para gran escala
	Hidrotérmico	Uso de agua a altas temperaturas	Disuelve la hemicelulosa y la lignina facilitando la hidrólisis	Generación de inhibidores

Termo-físico	Explosión de vapor	Expone la biomasa a temperaturas y presión altas de vapor, seguido de una caída repentina de presión	Degradación de la hemicelulosa y transformación de la lignina. Económico	Dstrucción de fracciones de xilano. Incompleta ruptura de lignina. Generación de inhibidores
	Explosión de amoniaco (AFEX)	Expone la biomasa a temperatura y presión moderada de amoniaco líquido, seguido de una caída repentina de presión	Aumento de área superficial. Remueve lignina y hemicelulosa y no produce inhibidores	No es eficiente en biomosas con alto contenido de lignina. Generación de inhibidores
	Explosión de CO ₂	Expone la biomasa a temperatura y presión moderada de CO ₂ , seguido de una caída repentina de presión	Incrementa área superficial, es medianamente económico y no forma productos inhibitorios	No modifica la hemicelulosa ni la lignina
Químico	Ácido	Adición de algún tipo de ácido como H ₂ SO ₄ o HNO ₃	Hidroliza la hemicelulosa y otros azúcares, altera la estructura de la lignina	Formación de aldehídos. Corrosión de equipo. Altos costos
	Alcalino	Adición de algún tipo de base	Remueve la lignina y otros grupos mediante la saponificación, produce una hinchazón de la materia	Aumenta el tiempo de residencia. Formación de sales. Costo elevado y su efectividad depende del contenido de lignina
	Ozonólisis	Adición controlada de ozono a presión y temperatura ambiente	Degradación de lignina. Permanece casi intacta la celulosa y hemicelulosa	Grandes requerimientos de ozono. Altos costos
	Organosolv	Uso de solventes orgánicos como metanol junto con algún catalizador como H ₂ SO ₄ a moderadas temperaturas	Reduce el contenido de lignina y no produce residuos tóxicos	El solvente requiere de ser recuperado. Altos costos
	Pirólisis	Somete a la materia a altas temperaturas	Energía auto sostenida. Produce productos líquidos y gaseosos	Degradación de azucares potenciales
Biológico	Micro-biológico	Microorganismos usualmente hongos que degradan la lignina y hemicelulosa	Bajos requerimientos de energía. Costos bajos	Tiempos de hidrólisis largos

2.6-2 Características generales de los subproductos inhibitorios generados en el material lignocelulósico por la acción de un pretratamiento

Como se observa en la tabla anterior (**Tabla 1**), el pretratamiento por lo general viene acompañado de la generación de subproductos y la mayoría de estas son sustancias que provocan inhibiciones enzimáticas, microbianas o ambas. Según estudios realizados, existen más de 100 compuestos con posible acción inhibitoria en la biomasa hidrolizada (**Figura 23**).

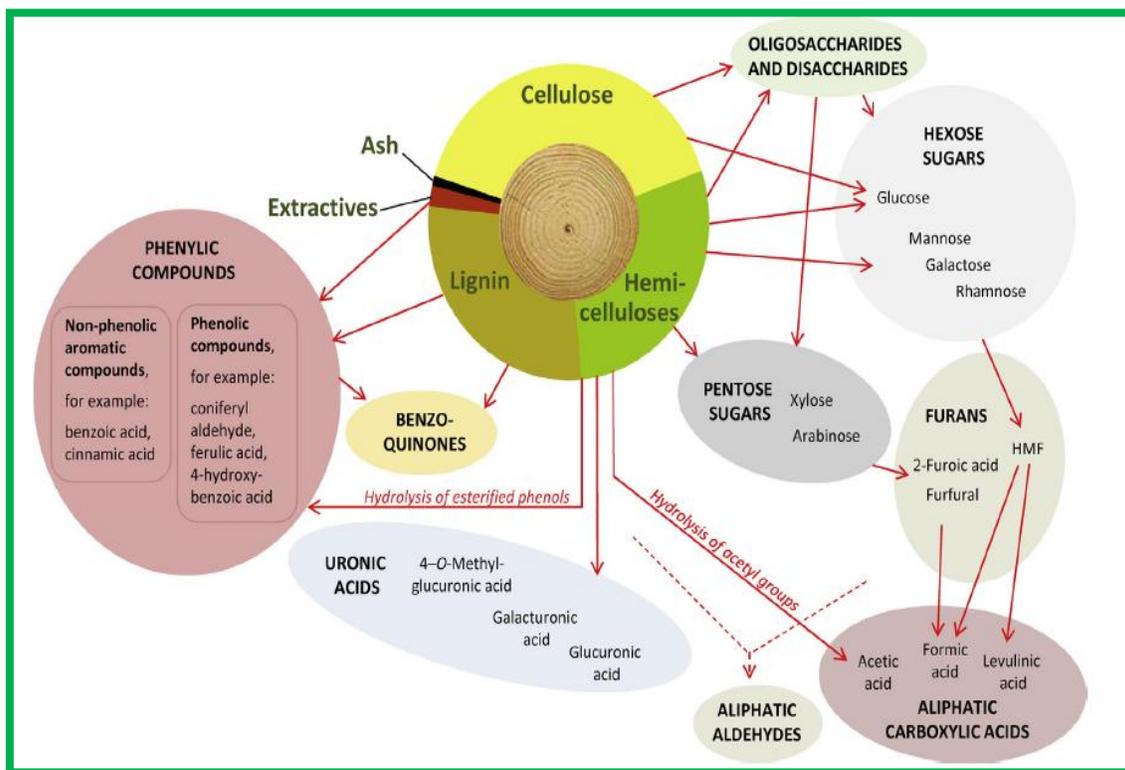


Figura 23: Principales derivados que resultan de algún pretratamiento lignocelulósico. (Jönsson & Martín, 2016)

Se sabe que la cantidad y el tipo de inhibidores dependen de la materia prima y el método de pretratamiento utilizado e incluyen desde compuestos fenólicos, aromáticos, terpenos, ácidos alifáticos, aldehídos de furano, iones inorgánicos, hasta alcoholes y azúcares que ocasionan inhibición por producto. Su clasificación está basada en el tipo de funcionalidad del compuesto ya que la inhibición está más relacionada con el grupo funcional de la cadena lateral como: aldehídos, cetonas, hidroxilos, ácidos y metoxilos. Además, estos inhibidores

tienen efecto sinérgico o aditivo, ya que su toxicidad aumenta significativamente en mezclas que como sustancias individuales, aunque su concentración individual sea muy alta, como por ejemplo, la inhibición sinérgica del furfural con ácido acético para *S. cerevisiae* (Klinke, et al., 2004).

Se ha demostrado inhibición enzimática por la adición en un 20% (w/w) de lignina, que resulta en una caída de la función catalítica desde un 10% hasta un 23%, dependiendo de la fuente de esta. Se cree que la adsorción irreversible de endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas en la lignina es impulsada por interacciones hidrofóbicas y posibles interacciones electrostáticas, siendo la enzima β -glucosidasas la que muestra mayor nivel de adsorción y pérdida de su actividad. Así mismo, fenoles con grupos hidroxilos y metoxilos, siendo el primero con mayor impacto negativo, inhiben las celulasas tras unirse en sus sitios catalíticos a través del mecanismo metiluro de quinona, impidiendo la unión entre la celulosa y las enzimas (Pan, 2008).

En experimentos de interacciones de celulasas y lignina, el máximo de adsorción generalmente se alcanza en unas pocas horas a temperatura ambiente y se observa una severa inactivación a 45°C, sin embargo a temperaturas de 4°C las enzimas conservan bien su actividad (Rahikainen, et al., 2011). Estas propiedades y otras han provocado la creación de posibles mecanismos para prevenir la adsorción de las enzimas en la superficie de lignina, ya que una forma de reducir costos del proceso sería mediante el reciclaje de estos catalizadores y a continuación se menciona algunos de estos mecanismos:

- Cambios de temperatura en el proceso de hidrólisis enzimática.
- Utilización de aditivos de recubrimiento que bloquee la superficie de lignina con surfactantes como poli etilenglicol o proteínas exógenas.
- Bloqueo químico de los grupos libres hidroxilo de la lignina mediante la hidroxipropilación.
- Celulasas resistentes a la desnaturalización o diseños de enzimas con uniones débiles a la lignina.

Como se había dicho, no solo los subproductos del pretratamiento afectan la hidrólisis, también existe inhibición en la fermentación de las levaduras por; aldehídos y cetonas, que dañan la membrana celular; fenoles, que aumentan la fluidez de la membrana afectando su permeabilidad; compuestos de bajo peso molecular, capaces de penetrar en las membranas e influir en la expresión del ADN-ARN y sales inorgánicas, que pueden afectar el equilibrio osmótico. (Brandt, et al., 2013)

El grado de toxicidad en la fermentación se presenta de mayor a menor grado: terpenos > aldehídos y cetonas > fenoles > ácido orgánicos > sales (Klinke, et al., 2004). Sin embargo, existen métodos para desintoxicar los hidrolizados como:

- Modificar la lignina al hidrolizar sus enlaces éter.
- Eliminación de la pulpa por el proceso Kraft.
- Tratamientos con sulfito o cal.
- Decantación y filtración de compuestos aromáticos, que son propensos a sufrir reacciones de condensación a temperatura ambiente.

No obstante, para realizar estos procedimientos es necesario un gran volumen de agua y su recirculación daría como resultado concentraciones más altas de inhibidores, por lo que sería necesario también un paso adicional de separado en el proceso (Klinke, et al., 2004). Un método de más largo alcance sería con ayuda de la ingeniería genética, al crear microorganismos transformados e hiperresistentes a compuestos inhibitorios.

2.7 EXTRUSIÓN

Un nuevo proceso de pretratamiento fue evaluado e implementado por un equipo de investigación (Vandenbossche, et al., 2014), el cual acopla un tratamiento alcalino-termo-físico en una unidad, mediante un extrusor de doble tornillo (**Figura 24**). Esta reciente tecnología con múltiples ventajas ha probado conseguir mucha mejor efectividad en el incremento del rendimiento en la hidrólisis y la fermentación del material lignocelulósico.

El mecanismo que emplea este extrusor, es un tratamiento alcalino, seguido por una etapa de neutralización, mientras la materia es impulsada y triturada por los tornillos co-rotativos, que al estar dividido por módulos se puede manipular la temperatura. También, esta tecnología permite la extracción de compuestos inhibitorios generados por el mismo tratamiento, mediante un filtro. Incluso, tiene la capacidad de inyección de enzimas, acoplado con ello el tratamiento bio-catalítico, llamado "bioextrusión" (Vandenbossche, et al., 2014). Las grandes ventajas de este nuevo proceso son:

- Proceso continuo que disminuye los tiempos del tratamiento.
- Disminución del consumo energético, debido al incremento del esfuerzo cortante, transferencia de calor, mezcla efectiva y operación a temperaturas bajas.
- Minimiza el consumo de agua al trabajar en una relación baja líquido/sólido.
- Es adaptable a diferentes biomásas.
- Mayor incremento en la accesibilidad del material lignocelulósico, que provoca mejores rendimientos en la hidrólisis y la fermentación.



Figura 24: Extrusor de doble tornillo.
(BABET-REALS, 2016)

3. JUSTIFICACIÓN

Gracias al surgimiento de los combustibles fósiles, el mundo ha evolucionado de manera exponencial en materia industrial, tecnológica y desarrollo económico, pero al mismo tiempo ha desencadenado una serie de consecuencias en México y el mundo desde incremento de tensiones entre países como Estados Unidos, Medio Oriente, Venezuela y Rusia, sobrepoblación, agotamiento de recursos no renovables, hasta descensos de personas por el incremento de la contaminación y el calentamiento global, como se explicó más detalladamente en la introducción.

No obstante, existen maneras de sustituir el combustible tradicional por recursos naturales, a través de los llamados BIOCOMBUSTIBLES y entre sus varias razones están:

- La biomasa es la fuente de energía renovable más grande, sostenible, amigable al medio ambiente y con capacidad de convertirse en combustibles sólidos, líquidos y gaseosos.
- Políticos en la Unión Europea, China y otras grandes áreas económicas han establecido regulaciones para promover el uso de biocombustibles respetuosos con el clima.
- El potencial de los residuos de Agave de la industria tequilera en México, que genera más de una megatonelada por año, como insumo para la generación de bioetanol.
- Fomentar en México la independencia energética y el empleo de miles de personas
- Aparece el proyecto BABET-REAL5 que desarrolla alternativas para la producción de etanol de segunda generación que incluye 11 socios europeos y 4 latinoamericanos.

Con base en lo anterior, esta investigación tendrá como tarea aportar diferentes estrategias de caracterización y mejorar el entendimiento de las modificaciones que sufre el bagazo de agave tras experimentar un tratamiento en el extrusor. Con esto se anhela incentivar a receptores, investigadores o incluso políticos a interesarse por este nuevo proceso de producción de biocombustible, que es amigable al medio ambiente y así establecer una acción de cambio para estimular su uso tras la crisis ambiental y energética en la actualidad.

4. OBJETIVOS

- Realizar la caracterización y el análisis de las modificaciones que sufrió el bagazo de agave tras el pretratamiento alcalino-termo-físico por medio del extrusor de doble tornillo a diferentes condiciones de temperatura, concentración de hidróxido de sodio, tiempos de residencia y empleo de la filtración en el proceso.
- Cuantificar y describir los cambios físico-químicos que presentan trece muestras extrudadas de bagazo de agave con diferentes condiciones de tratamiento, a través de la comparación de los resultados que arrojan las siguientes técnicas analíticas implementadas: espectroscopia de infrarrojo, difracción de rayos x, cromatografía líquida de alta resolución y sorción dinámica de vapor.
- Implementar y alentar el uso de nuevos métodos de análisis de resultados que pronostiquen en menor tiempo los rendimientos de la hidrólisis enzimática por medio de las técnicas analíticas empleadas en la caracterización.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Después del proceso de cocción de la piña y la extracción de sus azúcares, el residuo de bagazo de agave fue recolectado en la destilería Tequila Patrón. Este bagazo fue secado sobre un área amplia en condiciones ambientales para luego ser molido, resultando en dos tipos de materia; una fracción fibrosa y otra de partículas finas amorfas. Las dos fracciones fueron separadas utilizando una malla y así la fracción fibrosa se utilizó como muestra control para este estudio (Hernández-Meléndez, et al., 2016).

Para el pretratamiento alcalino-termo-físico se utilizó un extrusor de doble tornillo de diferentes segmentos, que giran co-rotativamente. El arreglo del extrusor consiste de 10 módulos (**Figura 25**); el primero, correspondió al de alimentación; el segundo y el quinto, contiene cada uno un inyector asociado a una bomba, que introducían una solución de NaOH para el tratamiento alcalino y de H_2SO_4 para la neutralización respectivamente; el sexto, es en donde se incluye la sección del filtro cuando se desea efectuar un proceso de filtración y el último módulo, contiene la salida donde se colecta la muestra extrudada para su posterior análisis. Los módulos no mencionados funcionaron como continuación del tratamiento térmico, mecánico y alcalino.

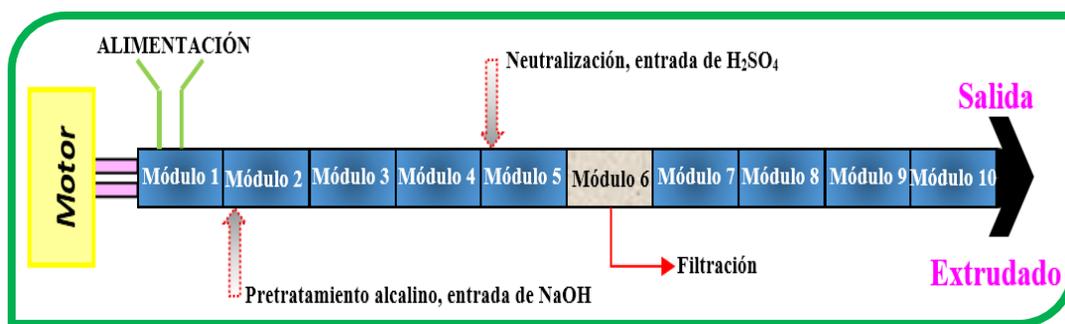


Figura 25: Representación esquemática de la configuración del extrusor de doble tornillo.

Los módulos se regulan térmicamente por inducción térmica y se enfrían mediante la circulación de agua. El perfil de temperaturas comienza a ascender desde el módulo 2 y alcanza la máxima temperatura en el módulo 4, en la que es específica para cada muestra

y se muestra en la (**Tabla 2**), para luego descender en los subsiguientes módulos. La sección del filtro consiste en dos secciones hemisféricas con agujeros cónicos y un caparazón con una boquilla que permitía la salida y la colección del filtrado.

Se estudió el impacto que ocasionó el pretratamiento en el bagazo de agave al ejecutar cuatro procedimientos de tratamiento independientes, las cuales generan mayor transformación a la materia:

- Diferentes porcentajes de concentración de hidróxido de sodio
- Variaciones en el perfil de temperaturas
- Efectuar un doble tiempo de residencia
- Implementar el proceso de filtración

Se desarrollaron 13 experimentos diferentes (**Tabla 2**) aplicando y mezclando estos cuatro procedimientos, donde (**R**) significa que se realiza un doble tiempo de residencia y (**F**) significa que se aplicó el proceso de filtración. Los extrudados, que son resultado de estos 13 experimentos y la muestra sin tratamiento, establecida esta última como muestra control para este estudio, son llevados a posterior análisis.

Tabla 2: Pruebas en el extrusor a diferentes condiciones de pre-tratamiento.

Muestra/Condiciones	Grupos de tratamiento	NaOH (%) Módulo 2	Temperatura máxima (°C) Módulo 4	Doble tiempo de residencia	Filtración Módulo 6
UNO	B	7.5	130.0		
DOS	A	5.0	120.0		
TRES		5.0	120.0	R	
CUATRO		3.75	100.0		
CINCO		3.75	100.0	R	
SEIS	B	3.75	190.0		
SIETE		3.75	150.0		
OCHO		3.75	130.0		
NUEVE		3.75	70.0		
DIEZ	C	5.00	120.0		F
ONCE		5.00	150.0		F
DOCE		3.75	120.0		F
TRECE		3.75	150.0		F
SIN TRATAMIENTO					

Las 13 muestras se agrupan en A, B y C (**Tabla 2**), como forma de organización para acotar y facilitar el análisis del efecto que tiene un específico procedimiento en los extrudados, pero también porque se observaron propiedades semejantes entre las diferentes muestras del mismo grupo cuando se caracterizaron.

- Grupo A: Análisis del efecto que tienen las muestras con un doble tiempo de residencia
- Grupo B: Análisis del efecto que tienen las muestras con cambios de temperatura o concentración de sosa
- Grupo C: Análisis del efecto que tienen las muestras con un proceso de filtración

Después de cada experimento se dejaron secar las trece muestras en la estufa a 70°C por 24 horas, luego se molieron con ayuda de un triturador y se tamizaron con el objetivo de que tuvieran el mismo tamaño de partícula (**Figura 26**).



Figura 26: Extrudado (1), extrudado seco (2) y triturador (3) del bagazo de agave.

6. METODOLOGÍAS EMPLEADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN

6.1 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Después de secarse y triturarse las muestras, se realizó la hidrólisis por triplicado con el cóctel enzimático *Cellic CTec2* de Novozyme, a una concentración de 15 FPU/gr_(materia seca), con una consistencia del 20% en un buffer de citratos a 0.05 M, un pH de 4.8 y a una temperatura de 50°C durante 48 horas con una agitación orbital de 200 rpm. Estas condiciones se utilizaron porque demostraron conseguir la mayor liberación de azúcares y un alto rendimiento hidrolítico (Montiel, 2016).

El rendimiento se definió como la razón de glucosa o xilosa liberadas en la hidrólisis entre el contenido total promedio de glucosa o xilosa que se encuentra en el de bagazo de Agave. Los azúcares liberados por la hidrólisis se miden mediante la técnica de HPLC (detallada más adelante) y el contenido total de estos azúcares son determinados por la cantidad de celulosa y hemicelulosa contenidas en el bagazo.

El método de análisis proximal de Van Soest-Wine determina el contenido de biopolímeros. Este procedimiento analítico está basado en la capacidad de diferentes detergentes de disolver y separar componentes específicos del material, para así conocer por medio de la diferencia de pesos el porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina en la materia. El porcentaje promedio de celulosa y hemicelulosa totales en las muestras fueron aportadas por el trabajo del laboratorio y son:

- En el grupo A y B contienen en promedio 37% de celulosa y 17% de hemicelulosa.
- En el grupo C contienen en promedio 50% de celulosa y 14% de hemicelulosa.

6.2 ESPECTROSCOPIA DE DIFRACCIÓN DE RX

Después de secarse y triturarse, las muestras extrudadas se tamizaron en una malla para dejar un polvo muy fino y posteriormente cada muestra fue enviada a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) para que se realizara la técnica de difracción de rayos X.

Para obtener los difractogramas de RX se utilizó el difractómetro *Bruker AXS*, que consiste de tubos de rayo X cerámicos, con radiación CuK_{α} a una longitud de onda de $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ y un filtro de níquel. Las condiciones de los experimentos se realizaron en un intervalo angular 2θ , que recorrió desde los 5° hasta los 50° con una velocidad de barrido en modo continuo a $0.001^{\circ}/\text{min}$. El proceso de ajuste que se realizó en los diferentes difractogramas fueron las correcciones de línea de base con el programa de *Origin 2017*.

6.3 ESPECTROSCOPIA DE TRANSMISIÓN DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER

Después secarse y triturarse, las muestras extrudadas se tamizaron en una malla para dejar un polvo fino y posteriormente cada muestra se envió a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) en la UNAM para que se realizará la técnica de espectroscopia infrarroja por transformada por Fourier.

Para realizar los espectros de FTIR se utilizó el espectrofotómetro *FTIR Spectrum RXI de Perkin-Elmer*, en donde se colocó una pequeña porción del polvo en la celada infrarroja del equipo, después la muestra se comprimió empleando una prensa y se sometió a una fuente de luz infrarroja, en un rango de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} a una resolución de 0.8 cm^{-1} . La intensidad de la luz transmitida a través de la muestra es medida en cada señal, lo que permite que la cantidad de luz absorbida por la muestra sea calculada por la diferencia entre la intensidad de la luz antes y después de pasar por la celda. El procesamiento de los

espectros y la detección de las diferentes señales se ejecutaron utilizando el programa *Origin 2017*.

6.4 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

6.4-1 Condiciones de la técnica HPLC para la determinación de azúcares

Las muestras hidrolizadas se centrifugaron y el sobrenadante se filtró con una membrana de 0.45 μm . Se utilizó la columna *Unison UK-Amino 250 mm por 3 μm* y un detector de dispersión de luz *PL-ELS 1000, Polymer laboratories, USA*. El gradiente de la fase móvil acetonitrilo:agua fue 80:20, con un volumen de inyección de 2 μL a un flujo de 0.2 mL/min durante 25 min, a una temperatura de 37°C y presión de 80 bar. Para la cuantificación de los azúcares se generaron curvas de calibración utilizando estándares de glucosa y xilosa.

6.4-2 Condiciones de la técnica HPLC para la determinación de compuestos inhibitorios

Para la determinación de compuestos inhibitorios realizada por triplicado, se eligieron 13 compuestos (**Figura 27**) con diversidad en sus grupos funcionales, con un alto poder inhibitorio para *S. cerevisiae* y las enzimas hidrolíticas de la celulosa según los artículos (Pan, 2008), (Klinke, et al., 2004), (Mitchell, et al., 2014). Para determinar la presencia y la cuantificación de estos compuestos en las muestras, se generaron curvas de calibración utilizando los siguientes 13 estándares (**Figura 27**) provistos por *Sigma Aldrich* a diferentes concentraciones.

ALDEHÍDOS		
	5-(hidroximetil)-furano-2-carbaldehído [5-hidroximetilfurfural, HMF] PM:126.11	4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído [Vainillina] PM:152.15
CETONAS:		
	1-(4-hidroxifenil)etanona [4'-Hidroxiacetofenona] PM:136.15	2-metoxifenol [Guayacol] PM: 124.14
FENOLES:		
	1,2-bencenodiol, 1,2-dihidroxibenceno [Catecol] PM:110.11	Hidroxibenceno [Fenol] PM:94.11
ÁCIDOS:		
	Acido benzoico PM:122.12	Ácido 4-hidroxi-3-metilbenzoico [Ácido Vanílico] PM:168.15
	Ácido 3,4-dihidroxibenzóico [Ácido protocatecuico] PM:154.12	Ácido(E)-3-(4hidroxi-3metoxi-fenil)propil-2-enoico [Ácido ferúlico] PM:194.18
	Ácido p-cumárico [Ácido 4-hidroxicinámico] PM:164.16	Ácido 3-(4hidroxi-3,5dimetoxifenil)prop-2E-enoico [Ácido Sinápico] PM:224.21
	Ácido 3,4 dihidroxicinámico [Ácido Caféico] PM:180.16	

Figura 27: Compuestos inhibitorios utilizados para las curvas de calibración.

Las muestras hidrolizadas se centrifugaron y el sobrenadante se filtró con una membrana de 0.45µm. Se utilizó la columna *Chromolith RP-18e 100-4.6 mm* y un detector de arreglo de diodos *DAD Agilent 1260a*, con una longitud de onda de 280 nm para todos los compuestos excepto para el ácido sinápico, que se analizó a 290 nm. Los gradientes de la fase móvil se muestran en la **Tabla 3**, el volumen de inyección fue de 10 µL, la temperatura de la columna es 25°C a una presión 200 bar y flujo de 1 mL/min.

Tabla 3: Composición de los diferentes gradientes de la fase móvil en la columna de HPLC.

Tiempo (min)	0	5	7.5	10	15	20	30	35	50
(%) Fase móvil: H ₂ O-CH ₃ COOH (99.8:0.2 v/v, pH 3.0)	98	98	96	95	95	93	93	83	50
(%) Fase móvil: MeOH	2	2	4	5	5	7	7	17	50

Es muy importante señalar que la determinación de los compuestos inhibidores en las muestras TRES, CINCO, SEIS, SIETE, OCHO, NUEVE y SIN TRATAMIENTO, se realizó sobre el sobrenadante del hidrolizado, es decir después de efectuar la hidrólisis enzimática, a las mismas condiciones en que se realizó la determinación de azúcares, sin embargo, las muestras UNO, DOS y CUATRO, no se llevaron a cabo por falta de material. Por otro lado, la determinación de los compuestos inhibidores en las muestras DIEZ, ONCE, DOCE y TRECE, se realizaron sobre el líquido extraído, resultado de la filtración en el módulo 6 del extrusor.

6.5. SORCIÓN DINÁMICA DE VAPOR

Después de secarse y triturarse, las muestras extrudadas se tamizaron en una malla. Los experimentos se realizaron en un analizador de adsorción de vapor gravimétrico automatizado *DVS Advantage (Surface Measurement Systems Ltd., Londres, Reino Unido)*.

Para obtener las isothermas características de los extrudados, cada muestra de entre 5 mg y 20 mg se colocaron en el porta muestra que está conectada a una microbalanza. La muestra se expone a un flujo de nitrógeno con una temperatura de 103°C y una humedad relativa del 0%, para eliminar el agua presente y establecer una masa de referencia seca.

Establecido el peso seco, enseguida se expone la muestra a diferentes etapas, mediante flujos de gas con distintos porcentajes de humedad relativa, que va de forma ascendente y descendiente con temperatura constante en 25°C: 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%. En cada etapa se registra el cambio en masa total que obtuvo después de la adsorción o desorción y para continuar con el siguiente porcentaje de humedad relativa, la muestra debe alcanzar el equilibrio másico, es decir que el peso de la muestra permanezca constante (**Figura 28**).

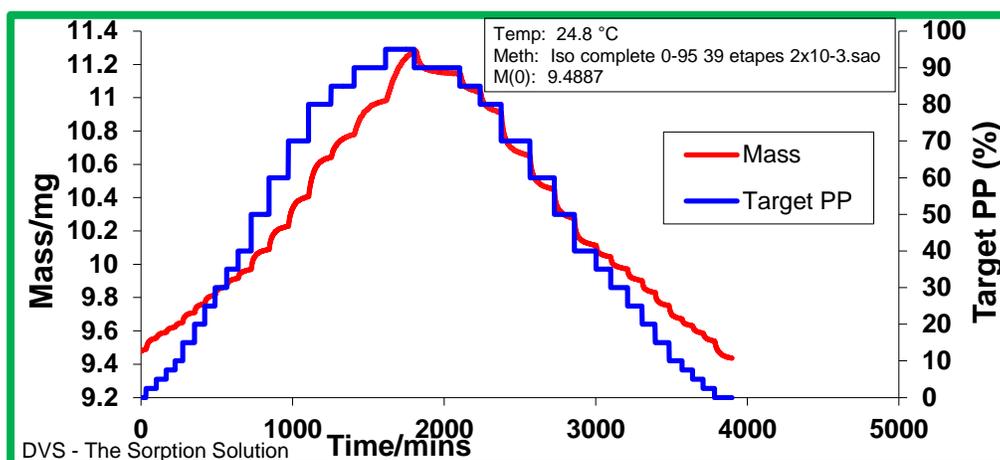


Figura 28: Cambio de masa en el tiempo en función del cambio de presión parcial.

A partir del perfil completo de los cambios de masa en las muestras, se generaron las isotermas (**Figura 29**) de cada muestra y con ella se calculó el área superficial y el volumen de porosidad utilizando el *software DVS (Advanced Analysis Suite v3.6)*.

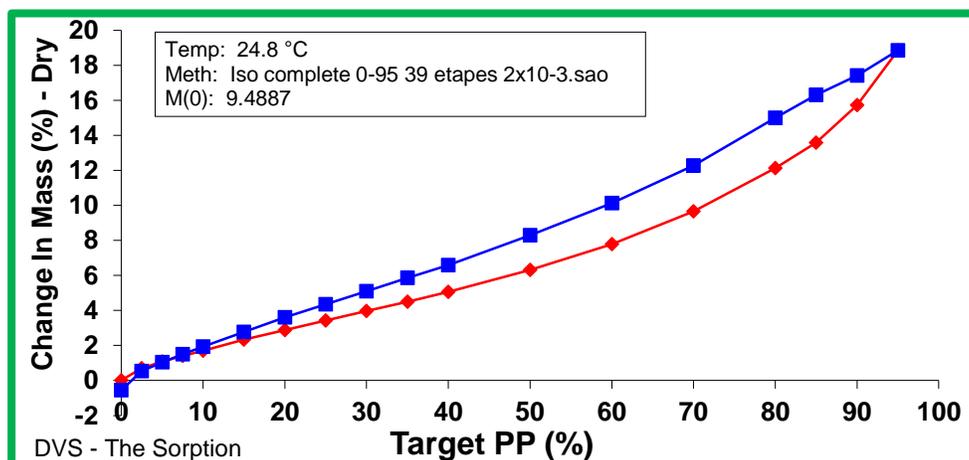


Figura 29: Isoterma de absorción y desorción de la muestra sin tratamiento.

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

7.1. RESULTADOS DEL POTENCIAL DE SACARIFICACIÓN

Se presenta la evaluación de trece diferentes condiciones de pretratamiento, a través del rendimiento hidrolítico enzimático de la celulosa y la hemicelulosa (**Tabla 4**).

Tabla 4: Resultados del porcentaje del rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Muestras [Porcentaje de NaOH Temperatura Doble tiempo de residencia o Filtración]	Grupo	%Glucosa	%Xilosa
UNO [7.50% 130°C]	B	29 ± 5.7	26 ± 2.1
DOS [5.00% 120°C]	A	48 ± 9.0	39 ± 3.6
TRES [5.00% 120°C R]	A	42 ± 9.2	33 ± 3.7
CUATRO [3.75% 100°C]	A	35 ± 11.6	29 ± 3.6
CINCO [3.75% 100°C R]	A	50 ± 8.3	30 ± 6.3
SEIS [3.75% 190°C]	B	67 ± 5.6	52 ± 1.6
SIETE [3.75% 150°C]	B	75 ± 7.7	55 ± 3.4
OCHO [3.75% 130°C]	B	72 ± 6.1	53 ± 4.7
NUEVE [3.75% 70°C]	B	55 ± 7.2	41 ± 1.4
DIEZ [5.00% 120°C F]	C	94 ± 4.3	48 ± 7.9
ONCE [5.00% 150°C F]	C	87 ± 2.8	53 ± 5.5
DOCE [3.75% 120°C F]	C	70 ± 3.8	51 ± 0.27
TRECE [3.75% 150°C F]	C	81 ± 1.8	47 ± 5.9
SIN TRATAMIENTO		10 ± 4.1	5 ± 9.3

7.1-1 Análisis de los resultados del potencial de sacarificación

Una de las principales formas de medir la efectividad del pretratamiento es a través del rendimiento en la hidrólisis enzimática y su comparación con el control SIN TRATAMIENTO. Como se observa en la **Tabla 4** cualquier condición incrementó el contenido de glucosa o xilosa, por lo que es evidente que el proceso alcalino-termo-físico facilita la liberación de la celulosa y efectúa una desintegración parcial de componentes externos que obstaculizan el paso de las enzimas al interior del material.

Del grupo A, que analiza el beneficio de aplicar un doble tiempo de residencia para incrementar la accesibilidad hacia la celulosa. Se observa que la muestra DOS [5.0|120] obtuvo bajos rendimientos, probablemente se deba a que la alta concentración de sosa afectó los componentes lignocelulósicos y provocó destrucción de material con potencial de sacarificación o se incrementó considerablemente el número de sustancias nocivas que pudieron alterar el efectivo desarrollo enzimático (Pan, 2008) y si a eso le añades un mayor tiempo de residencia termina por afectar aún más el rendimiento como se comprueba en la disminución de rendimiento en la muestra TRES [5.0|120|R]. En cambio, en las muestras CUATRO [3.75|100] y CINCO [3.75|100|R], que experimentaron condiciones menos agresivas, el empleo de doble tiempo de residencia si favoreció el incremento en el rendimiento. Por lo que se concluye que; el uso de un doble tiempo de residencia si es efectivo para la remoción de lignina y la hemicelulosa en condiciones de temperatura y porcentaje de sosa bajas.

Por otro lado, se sabe que el NaOH y la temperaturas provoca hinchazón, aumentan la capacidad de retención de agua, despolimerización de celulosa-hemicelulosa-lignina e incremento de área superficial, que facilitan el transporte y la actividad enzimática (Saratale & Oh, 2015). Por esta razón se estudió el efecto la sosa y la temperatura en las muestras de grupo B, para obtener las condiciones óptimas a las que se generan mayor porcentaje de glucosa. Se encontró que a condiciones mayores del 5.0% de NaOH y 150°C reduce la efectividad de tratamiento y provoca un desplome en el rendimiento hidrolítico, esto puede deberse a una sobre despolimerización que descompone o carboniza el material con capacidad de generar azúcares fermentables. Así mismo, un tratamiento con condiciones por debajo de 3.0% de NaOH y 120°C no es lo suficientemente fuerte para separar los componentes lignocelulósicos limitando la efectividad enzimática.

Como se había explicado antes, la inhibición de las enzimas celulólicas es amplia, desde problemas de transferencia de masa, inhibición por sustrato y producto, efectos del tamaño de partícula y la unión no productiva de enzimas con lignina. (Ximenes, et al., 2010). Por lo que

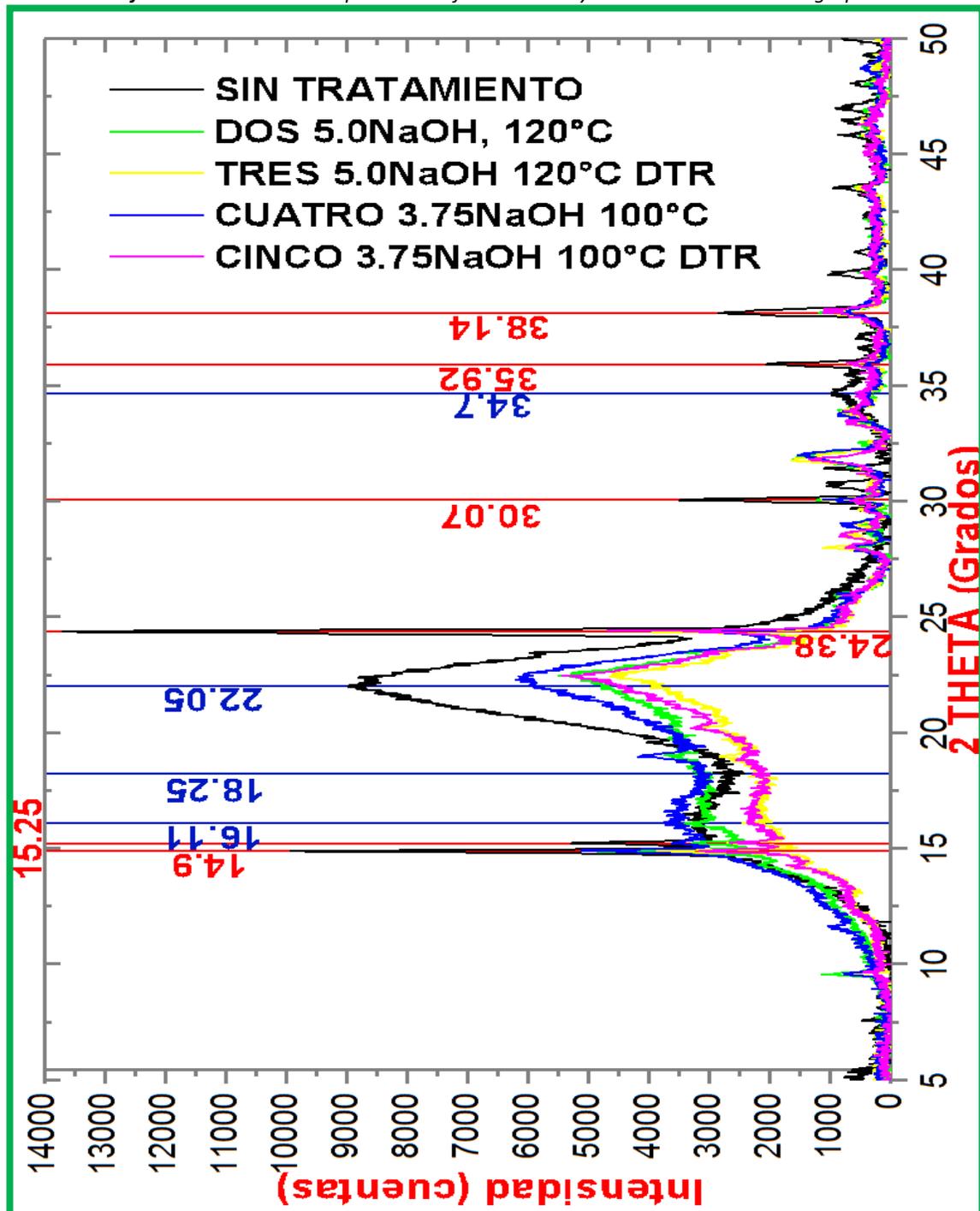
la filtración de compuestos de lignina o hemicelulosa liberados durante el tratamiento, con capacidad tóxica o impedimento del paso enzimático, logró incrementar hasta más del 20% la hidrólisis enzimática de la glucosa, si se compara entre muestras con y sin filtración. Este nuevo método en el grupo C permite amplificar el acceso a la celulosa y remover los subproductos que afecten el rendimiento.

Los rendimientos de la xilosa no muestran una clara tendencia y casi todas las muestras no difieren mucho en el porcentaje entre una y otra, esto puede deberse a que la enzima utilizada es principalmente para la celulosa, sin embargo, si se percibe una disminución del rendimiento a concentraciones de sosa superiores al 5%.

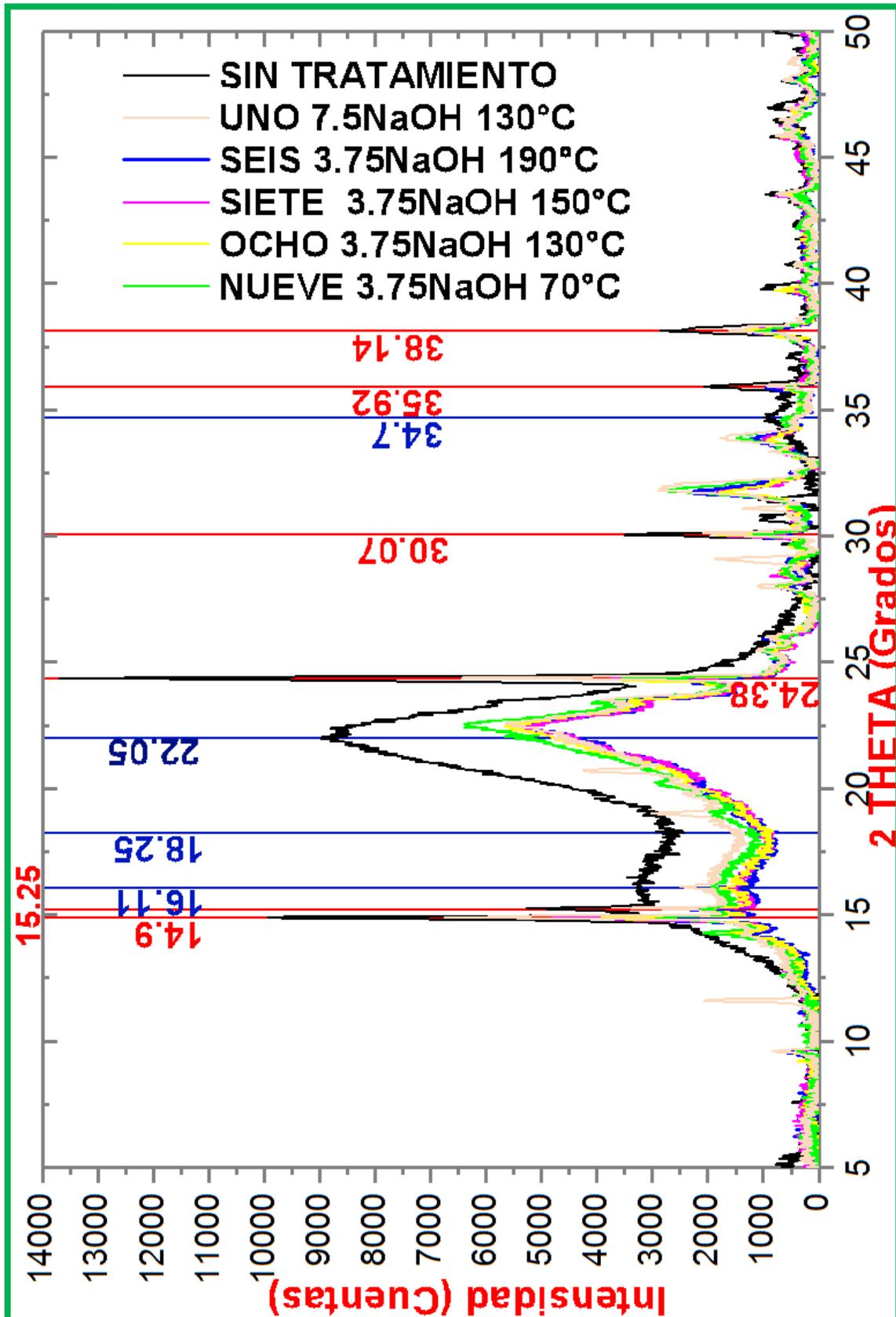
7.2. RESULTADOS DE LOS DIFRACTOGRAMAS POR RAYOS X

Se presentan los difractogramas de rayos X de las 13 diferentes muestras extrudadas y la muestra SIN TRATAMIENTO en la (*Gráfica de resultados 1, 2 y 3*).

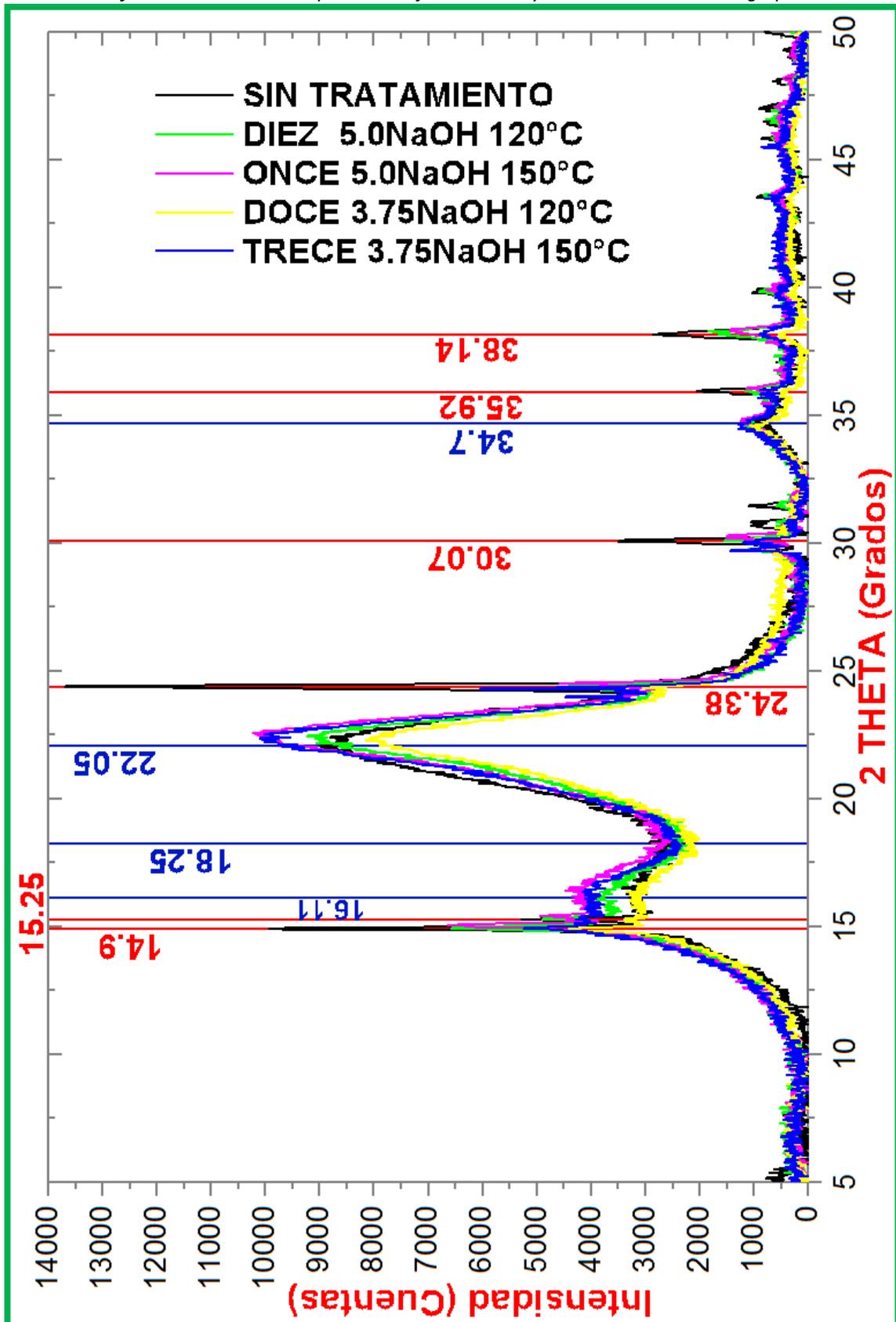
Gráfica de resultados 1: Espectro de difracción de rayos X de las muestras del grupo A.



Gráfica de resultados 2: Espectro de difracción de rayos X de las muestras del grupo B.

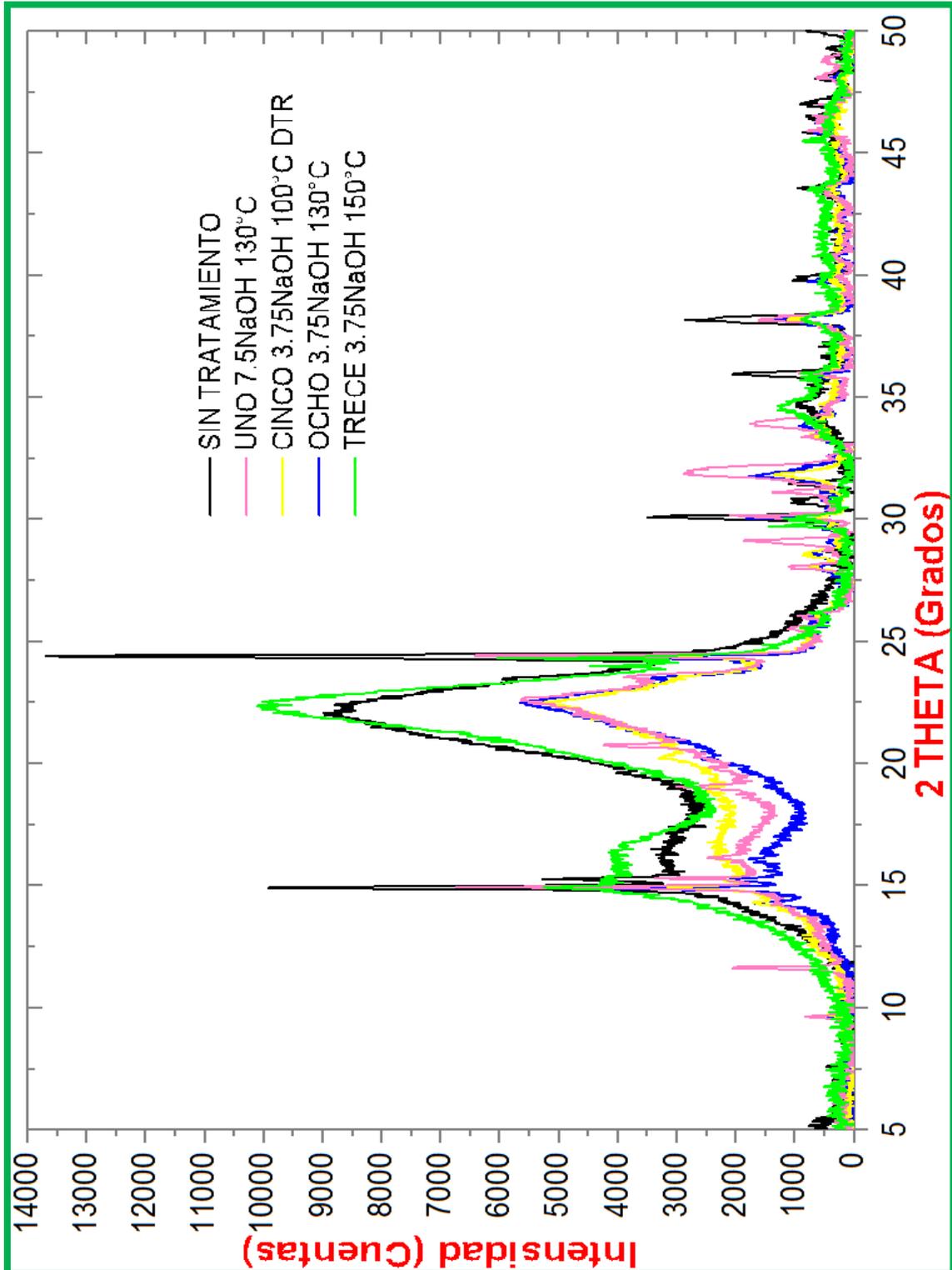


Gráfica de resultados 3: Espectro de difracción de rayos X de las muestras del grupo C



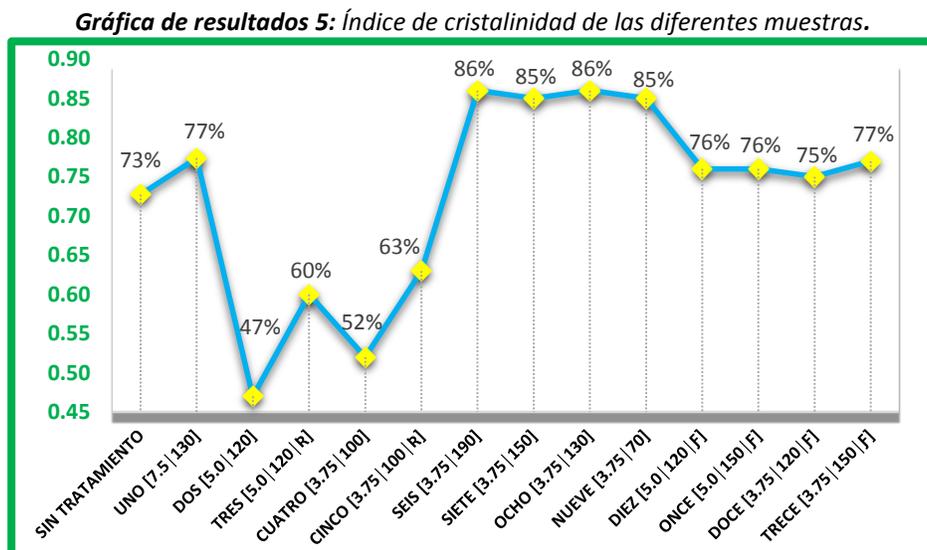
Enseguida se comparan los difractogramas de rayos X de los cuatro principales tratamientos realizados en el extrusor y la muestra control (**Gráfica de resultados 4**).

Gráfica de resultados 4: Difractogramas de los principales tratamientos realizados en el extrusor.



7.2-1 Análisis de los espectros de difracción de rayos X

Los difractogramas muestran principalmente dos anchas reflexiones o picos que identifican a la celulosa tipo I, el principal en $2\theta \sim 22.6^\circ$ (2 0 0) y el segundo en $2\theta \sim 16.0^\circ$, siendo este último en realidad dos picos superpuestos en $2\theta \sim 15.16^\circ$ (1 $\bar{1}$ 0) y en $2\theta \sim 16.60^\circ$ (1 1 0) (Yue, et al., 2015). Existe una reflexión de menor intensidad en $2\theta \sim 18^\circ$ que representa el material amorfo y que si se relaciona con el pico principal permite conocer el porcentaje de cristalinidad mediante el método de Segal (**véase anexo**). En la siguiente **Gráfica de resultados 5** se muestran el índice de cristalinidad (IC) de las diferentes muestras y el control.



Interpretación de los difractogramas y los índices de cristalinidad de cada muestra:

La muestra SIN TRATAMIENTO o control alcanza un IC del 73%, que es considerablemente alto en comparación con otros materiales naturales sin procesar, que contienen entre 40% y 60%. Cabe recordar que esta muestra control se obtuvo después de un proceso de cocción, molienda, secado y trituración, por lo que es posible que estos tratamientos hayan causado el incremento del IC y si se compara con otros estudios que realizan algún tipo de tratamiento se obtiene un porcentaje similar (Nam, et al., 2016). Además se ha propuesto que

la causa de este alto grado de cristalinidad resulta de una matriz externa de hemicelulosa-lignina que mantienen un empaquetamiento cerrado, compactado y organizado en las cadenas de celulosa, que provoca una estructura lignocelulósica muy densa y ordenada (Teli & Jadhav, 2017).

La muestra UNO [7.5% | 130°C] incrementa solo el 4% el IC, en comparación al control SIN TRATAMIENTO. Este pequeño incremento no coincide con la lógica de una mayor eliminación del contenido amorfo de hemicelulosa-lignina que se esperaría tras un tratamiento con alto porcentaje de NaOH. Sin embargo, este comportamiento se ha observado en otros estudios (Liu & Hu, 2008) y la explicación que se atribuye, es que comienza la transformación de la celulosa tipo I a la celulosa tipo II. Es decir, a concentraciones bajas de sosa el índice de cristalinidad aumenta, pero a medida que aumenta la concentración de sosa existe un punto de inflexión en el que el IC comienza a descender y empieza la transformación a una celulosa tipo II.

Otra interpretación que se da, es que a medida que se aumenta la concentración de sosa en el tratamiento, también se incrementa la viscosidad y se impide un efectivo transporte hacia el interior del material de los iones hidroxilos que hinchen y alteren la estructura de la celulosa (Liu & Hu, 2008). Por otro lado, si se observa el difractograma, no existe el desplazamiento del pico principal ($2\theta \sim 22.5^\circ$) para generar el doblete de ($2\theta \sim 21.7^\circ$) con ($2\theta \sim 20.0^\circ$), ni tampoco se observa un evidente surgimiento del pico ($2\theta \sim 12.1^\circ$) que son típicos de la celulosa II. Por lo que estos resultados sugieren que la solución de sosa no pudo penetrar eficazmente a la red de celulosa, ni transformarla a su alomorfo tipo II. Es decir, este tratamiento únicamente provocó una fuerte reacción en la matriz externa, por lo que solo se logró parcialmente una modificación de la celulosa y una exposición de grandes cantidades de otros cristales que están dentro de la red lignocelulósica (Cheng, et al., 2011).

Las muestras del grupo A, es decir las muestras DOS [5.0% | 120°C], TRES [5.0% | 120°C | R], CUATRO [3.75% | 100°C] y CINCO [3.75% | 100°C | R] presentan el IC más bajo, alcanzando el

46%, con 26 unidades menos en comparación con el control. La razón que aportan otros estudios, con un comportamiento similar, es que a medida que aumenta la concentración de NaOH, sin llegar a un fuerte aumento de la viscosidad, la cantidad de agua libre disponible para hidratar los iones hidroxilos disminuye. Estos iones deshidratados son más pequeños y pueden penetrar más fácilmente en la red cristalina, consiguiendo hincharla y provocar una reacción más profunda a la matriz transformando la celulosa a su forma alotrópica tipo II (Liu & Hu, 2008).

Sin embargo, si se observan los difractogramas no se observan las reflexiones típicas de la celulosa II, por lo que al igual que la muestra UNO [7.5% | 130°C], la solución de sosa no logró la transformación a celulosa tipo II y por contrario se observa un incremento en las partes amorfas, lo que significa que en este grupo no consiguió eliminar partes de hemicelulosa y lignina e incluso logró incrementar partes amorfas de la celulosa, pero si, el DTR favorece la eliminación de la matriz amorfa lignocelulósica (Cheng, et al., 2011).

Las muestras SEIS [3.75% | 190°C], SIETE [3.75% | 150°C], OCHO [3.75% | 130°C] Y NUEVE [3.75% | 70°C] del grupo B con el índice de cristalinidad más alto de todos los grupos con hasta un 86%. Este índice señala que el tratamiento en estas muestras fue eficaz en la degradación de la hemicelulosa-lignina y posiblemente de fracciones de celulosa amorfa (Zhang, et al., 2019). La explicación de estos resultados es que a concentraciones bajas en el tratamiento con sosa, la viscosidad se reduce y se favorece su transporte, logrando penetrar y romper la estructura de la celulosa, con lo que se incrementa la remoción de partes amorfas. Por otro lado, es probable que las regiones interfibrilares sean menos densas o rígidas y provoque que las fibrillas sean capaces de reorganizarse por sí mismas y en consecuencia se incremente el índice de cristalinidad que permite mayor accesibilidad de las enzimas hacia las fibras de la celulosa (Liu & Hu, 2008).

Las muestras filtradas DIEZ [5.00% | 120°C | F], ONCE [5.00% | 150°C | F], DOCE [3.75% | 120°C | F] y TRECE [3.75% | 150°C | F] o grupo C señalan un parecido mucho mayor al

difractograma del bagazo control SIN TRATAMIENTO en comparación con las demás muestras. En cuanto al IC esta disminuye con respecto al grupo B, pero es mayor a la muestra control y a las muestras del grupo A con un promedio de 76% por lo que indica que parte de la estructura amorfa es removida, pero no al grado del grupo B. Sin embargo, si se observan los picos correspondientes a $2\theta \approx 22.6^\circ$, $2\theta \approx 16.0^\circ$ y la reflexión amorfa en $2\theta \approx 18.0^\circ$, estas presentan mayor intensidad que cualquiera de las demás muestras y esto puede deberse a que la filtración elimina el agua absorbida que probablemente contiene componentes que interfieren con la refracción como la lignina, hemicelulosa, compuestos solubles, entre otros y también porque al extraer el agua la celulosa se recristaliza, pero no se logró eliminar las regiones amorfas como el grupo B.

Finalmente, si se compara los porcentaje del IC en las muestras de un mismo grupo las diferencias son insignificantes (menores a 10% de unidades), excepto para las muestras del grupo A (Vandenbossche, et al., 2014). Por lo que se infiere que el proceso del doble tiempo de residencia tiene un gran impacto en la estructura del material (con cambios del 13%), seguido de modificaciones en porcentaje de sosa (con cambios del 9%) y por último los que sufrieron los menores cambios o nula transformación en la estructura es la temperatura (con cambios del 1%).

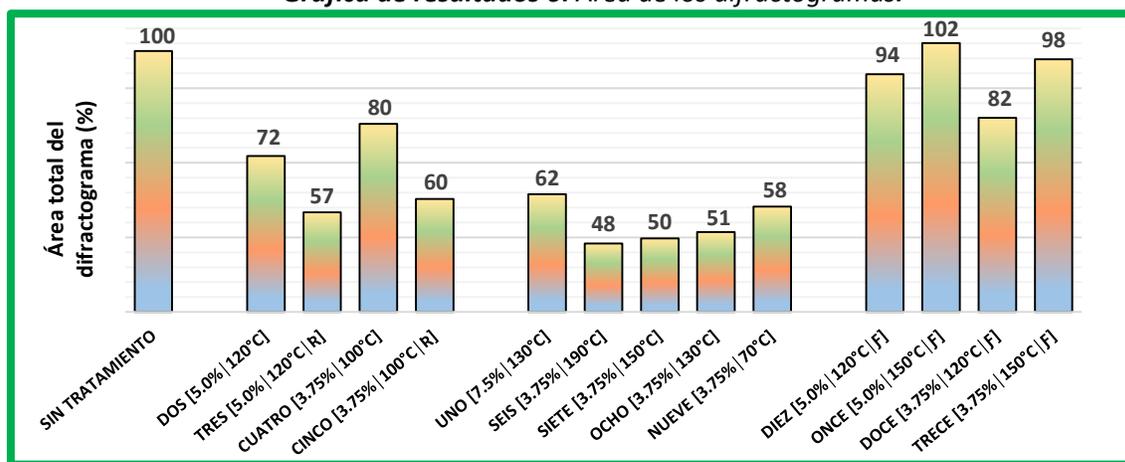
Así mismo, en este estudio se muestra una tendencia que entre mayor es el IC, más probabilidades existen de obtener un porcentaje alto en la hidrólisis enzimática, ya que significa que partes amorfas son removidas. Por otro lado, las muestras filtradas no aumentaron significativamente el IC en comparación con la muestra control, pero obtuvieron altos rendimientos hidrolíticos, esto señala que un alto IC no es una medida absoluta que garantice un alto desempeño en la hidrólisis enzimática. Sin embargo, esta técnica junto con otras podría ayudar a pronosticar el comportamiento e identificar las muestras, pero es necesario más experimentos que normalicen y vinculen los diferentes tratamientos con los IC.

Se concluye, que este método como muchos otros no provén un acertada determinación de la estructura del material y no se puede esperar que una simple comparación de alturas proporcione una evaluación razonable de la cantidad existente de celulosa cristalina (**véase anexo**). En realidad, el IC se vuelve poco preciso cuando se analizan muestras altamente amorfas, como resultado de tener un amplio perfil de difracción, por lo que, se sugiere que solo se use como un rápido método empírico para estimar la proporción amorfa y cristalina, que permite una comparación relativa entre las muestras (Sunkyu, et al., 2010).

A continuación, se presentan otras manifestaciones en los difractogramas de rayos X que permite distinguir e identificar las condiciones de tratamiento que se aplicaron y proporcionar otros parámetros que caractericen las transformaciones en la estructura del material:

- Área bajo la curva del difractograma teniendo como referencia del 100% a la muestra control SIN TRATAMIENTO.

Gráfica de resultados 6: Área de los difractogramas.

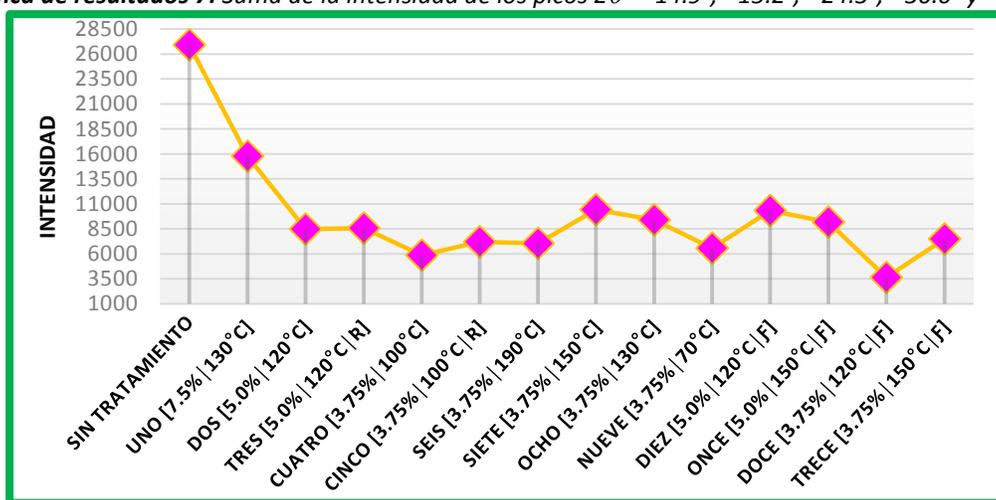


De la **Gráfica de resultados 6** se percibe que el área total de los difractogramas del grupo A y B disminuyen en promedio un 40% en relación a la muestra control, que a diferencia del grupo C, con una disminución promedio del 6%, prueba que la filtración permite la intensificación de las difracciones. La disminución del área posiblemente se debe a la

interferencia de diversos componentes y al contenido de agua o sustancias solubles que interaccionan con la celulosa y que modifican su estructura cristalina, por el contrario, el grupo C con un proceso de filtración y menor contenido de agua atrapada dentro de las muestras permite la recristalización de su celulosa y la reducción de interferentes. Así mismo, la muestra control a pesar de tener mayor número de sustancias que puedan interferir, posiblemente su estructura está altamente organizada y con poco contenido de agua que interaccione con la celulosa permitiendo un adecuado proceso de difracción.

- Suma de la intensidad de los picos $2\theta = \sim 14.9^\circ, \sim 15.2^\circ, \sim 24.3^\circ, \sim 30.0^\circ$ y $\sim 38.1^\circ$ característicos de la muestra control y permanentes aún después del tratamiento.

Gráfica de resultados 7: Suma de la intensidad de los picos $2\theta = \sim 14.9^\circ, \sim 15.2^\circ, \sim 24.3^\circ, \sim 30.0^\circ$ y $\sim 38.1^\circ$.



Estos picos se han identificado propios de un mineral insoluble llamado oxalato de calcio ($\text{Ca}_2\text{C}_2\text{O}_4$) (Hernández-Meléndez, et al., 2016). Así mismo en la **Gráfica de resultados 7**, no parece haber una tendencia clara en el incremento o disminución de este mineral por las condiciones de tratamiento excepto para la muestras control que presenta mucha mayor intensidad y demuestra que gracias al tratamiento este mineral es transformado en otra sustancia o es eliminado.

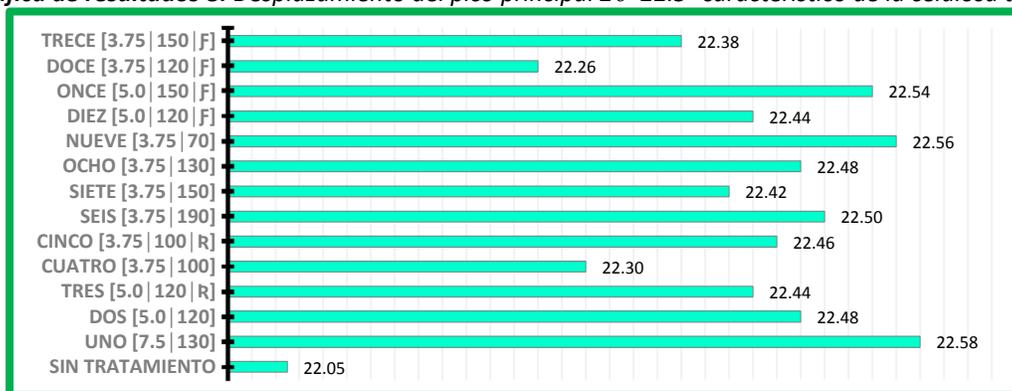
Por otro lado, la poca disminución en la intensidad de la suma de los picos que identifican al $\text{Ca}_2\text{C}_2\text{O}_4$ en la muestra UNO [7.5%|130°C] reafirma la explicación del artículo de (Liu & Hu, 2008), que a concentraciones altas de sosa la viscosidad aumenta y se entorpece la capacidad de reaccionar dentro de la matriz. Pero en mi opinión, es tan fuerte la concentración de sosa que descompone fuertemente los componentes de hemicelulosa y lignina, permitiendo una mayor expresión de estas sustancias inmersas.

- Manifestación de picos $2\theta = \sim 19^\circ, \sim 28^\circ, \sim 29^\circ, \sim 32^\circ, \sim 34^\circ$ y $\sim 39^\circ$ que se asemejan al patrón de difracción que identifica al sulfato sódico (Liu, et al., 2018), posiblemente resultado del tratamiento con sosa que no logro reaccionar con el bagazo y terminó neutralizándose a través de una reacción ácido-base que produce Na_2SO_4 y agua. Así mismo estos picos se observan en mayor intensidad en muestras con un tratamiento muy agresivo o en muestras con bajo rendimiento hidrolítico posiblemente debido a que la sosa no logro reaccionar con el bagazo y solo es transformado en una sal. En las muestras filtradas no se muestra el surgimiento de estos picos.
- Se localiza el surgimiento de un pequeño pico abultado en $2\theta = \sim 12^\circ$ y $\sim 20^\circ$ característico de la celulosa tipo II (Liu & Hu, 2008) en algunas de las muestras del grupo A y B. Sin embargo, es mínima la intensidad sugiriendo que solo muy poca cantidad de celulosa tipo II está presente (Cheng, et al., 2011).
- Disminución de diversos picos al efectuar el proceso de filtración como $2\theta = \sim 9.6^\circ, \sim 11.6^\circ, \sim 12.2^\circ, \sim 14.3^\circ, \sim 19.0^\circ, \sim 20.7^\circ, \sim 25.5^\circ, \sim 26.0^\circ, \sim 28.0^\circ, \sim 31.4^\circ, \sim 32.0^\circ$. Esto indica que diversos de los cristales se solubilizan y son removidos gracias a la extracción del agua dentro del extrusor. Al mismo tiempo este proceso provoca incrementos en la intensidad de los amplios picos característicos de la celulosa tipo I es decir $2\theta = \sim 16^\circ$ y $2\theta = \sim 22.5^\circ$ que como anteriormente se había explicado se debe a una recristalización de la celulosa y eliminación de sustancias interferentes.

- Una reflexión más estrecha de los picos del difractograma que caracterizan a la celulosa indican que se tienen cristales más grandes y por lo tanto una relación superficie/volumen más pequeña según (Garvey, et al., 2005). Por lo cual si se analizan las muestras sus difracciones se estrecharon debido al tratamiento en comparación de la muestra control lo que sugiere que los cristales aumentaron de tamaño.
- Desplazamiento del pico principal característico de la celulosa tipo I hacia ángulos más altos (**Gráfica de resultados 8**). Según (Cheng, et al., 2011), el cambio gradual de la posición del pico principal de celulosa I a un ángulo más bajo indica una expansión de la red de celulosa I. Pero, al contrario del artículo, el tratamiento promueve el desplazamiento hacia ángulos más altos, es decir, que gracias al proceso de extrusión, este empieza a mostrar mayor parecido al del difractograma que identifica a la celulosa pura de tipo I en $2\theta=22.6^\circ$, lo que puede llevar a un incremento en la hidrólisis.

Si se analizan los tratamientos, las muestras con condiciones menos agresivas se encuentran con el pico principal desplazado hacia ángulos de menor magnitud y por el contrario, a condiciones más agresivas, el pico principal se encuentra desplazado hacia ángulos de mayor magnitud. Esta relativa tendencia podría señalar que tanto se asemeja la muestra extrudada con la celulosa tipo I.

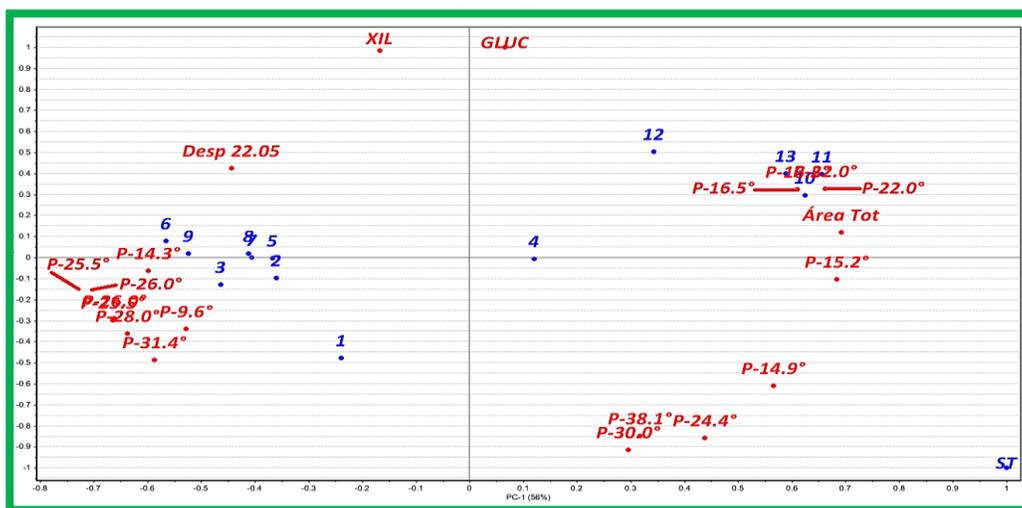
Gráfica de resultados 8: Desplazamiento del pico principal $2\theta=22.5^\circ$ característico de la celulosa tipo I.



Se realiza los análisis de componentes principales para describir y relacionar los diferentes datos que se obtienen a través de la técnica de rayos X. En el primer análisis (**Gráfica de resultados 9**), se correlacionan las muestras extrudadas, el control y los principales resultados medidos por los diferentes difractogramas que se señalan a continuación, con lo que se explica su varianza en un 81%.

- Muestras pretratadas: UNO [7.50%|130°C]=(1), DOS [5.00%|120°C]=(2), TRES [5.00%|120°C|R]=(3), CUATRO [3.75%|100°C]=(4), CINCO [3.75%|100°C|R]=(5), SEIS [3.75%|190°C]=(6), SIETE [3.75%|150°C]=(7), OCHO [3.75%|130°C]=(8), NUEVE [3.75%|70°C]=(9), DIEZ [5.00%|120°C|F]=(10), ONCE [5.00%|150°C|F]=(11), DOCE [3.75%|120°C|F]=(12), TRECE [3.75%|150°C|F]=(13) y SIN TRATAMIENTO=(ST).
- Rendimientos hidrolíticos: rendimiento de glucosa (GLUC) y rendimiento de xilosa (XIL).
- Índice de Cristalinidad (IC).
- Desplazamiento del pico 22.5° (Desp 22.5°).
- Área total bajo la curva del difractograma (Área Tot).
- Altura de los principales picos que aparecen en el difractograma (P-9.6°, P-11.6°, P-12.2°, P-14.3°, P-14.9°, P-15.2°, P-16.5°, P-18.2°, P-19.0°, P-20.7°, P-22.0°, P-24.4°, P-25.5°, P-26.0°, P-28.0°, P-29.1°, P-30.0°, P-31.4°, P-34.6° y P-38.1°).

Gráfica de resultados 9: ACP de las muestras, los rendimientos y los principales resultados de los difractogramas.



De la gráfica anterior, no se encuentran algunos valores medidos por medio de los difractogramas, ya que estos datos tienen una correlación menor al 50% de la totalidad de los datos, es decir, no influyen en el comportamiento general de las muestras y por esta razón estos datos son eliminados. Por otro lado, la proximidad entre las muestras y los resultados o entre ellas mismas reflejan una mayor correlación.

De la **Gráfica de resultados 9** se observa una mayor correlación entre los grupos A y B, sugiriendo que obtuvieron estructuras similares después del tratamiento, excepto la muestra CUATRO [3.75%|100°C], que a pesar de tener condiciones experimentales parecidas al tratamiento NUEVE [3.75%|70°C] y OCHO [3.75%|130°C], no logró conseguir la modificación estructural de estas dos últimas muestras, posiblemente debido a otros factores propios del experimento. Por otro lado, el tratamiento UNO [7.50%|130°C] con condiciones muy agresivas también señala una separación del grupo A y B, sin embargo este resultado es lógico ya que la alta concentración de sosa pudo afectar más intensamente la estructura de la muestra.

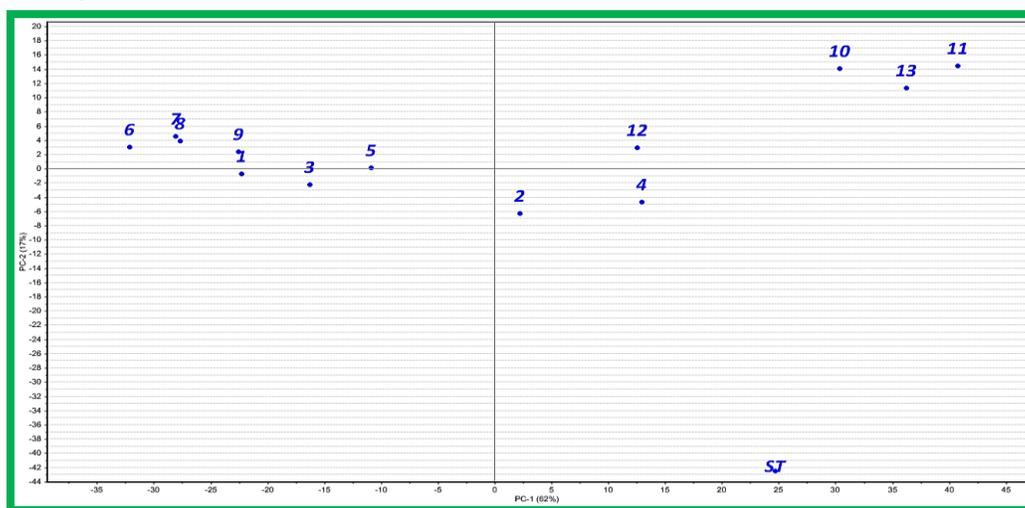
Por otro parte, las muestras del grupo C están próximas entre ellas ya que la filtración provoca cambios configuraciones semejantes que se reflejan en el los resultados del difractograma. La colocación de la muestra SIN TRATAMIENTO está alejada de todas las muestras y denota que su estructura es completamente diferente a las demás muestras por no experimentar un tratamiento.

Para finalizar, gracias a la **Gráfica de resultados 9** se distinguen muestras con estructuras semejantes y los principales valores medidos que identifican a esas muestras, como por ejemplo, la muestra SIN TRATAMIENTO contiene una mayor intensidad en las reflexiones $2\theta=14.9^\circ$, 15.2° , 24.4° , 30.0° y 38.1° (característicos del oxalato de calcio) y refleja que no hubo transformaciones de esos picos por la falta de tratamiento. Así mismo, mayor área total e intensidad en las reflexiones $2\theta=22.0^\circ$ y 16.5° de las muestras filtradas. Es decir, este

análisis facilita la identificación y la caracterización de los resultados en las muestras con los distintos tratamientos.

A continuación la **Gráfica de resultados 10**, se realiza el ACP pero contemplando ahora todo el rango de difracción de $2\theta=5^\circ$ a $2\theta=40^\circ$ con 1571 señales en el difractograma, de los cuales solo se tomaron en cuenta 1089 datos, ya que fueron eliminados los que tuvieron una correlación menor al 50% y que además explica la varianza de los resultados en un 79%.

Gráfica de resultados 10: ACP de las muestras a través de la totalidad de los datos de DRX.



Analizando esta última, se identifica al grupo A con cambios más notables y revela mayor modificación estructural entre las muestras de este grupo a comparación de los otros grupos. Por lo tanto, un doble tiempo de residencia logra modificaciones más fuertes que la concentración de sosa y los cambios de temperatura, como se había mencionado antes.

Por otro lado, si se analiza el componente uno de la **Gráfica de resultados 10**, las muestras con estructura opuesta están íntimamente ligadas a sus condiciones de tratamiento. Es decir del grupo B, las muestras SEIS [3.75% | 190°C] y NUEVE [3.75% | 70°C] con condiciones de temperaturas opuestas se localizan más alejadas entre ellas, lo mismo entre las muestras filtradas DOCE [3.75% | 120°C | F] y ONCE [5.00% | 150°C | F] y las muestras del grupo A con doble tiempo de residencia y sin doble tiempo de residencia. Por lo que en definitiva, gracias

al ACP se logra identificar fácilmente cuales muestras tienen mayores similitudes y cuales muestras no.

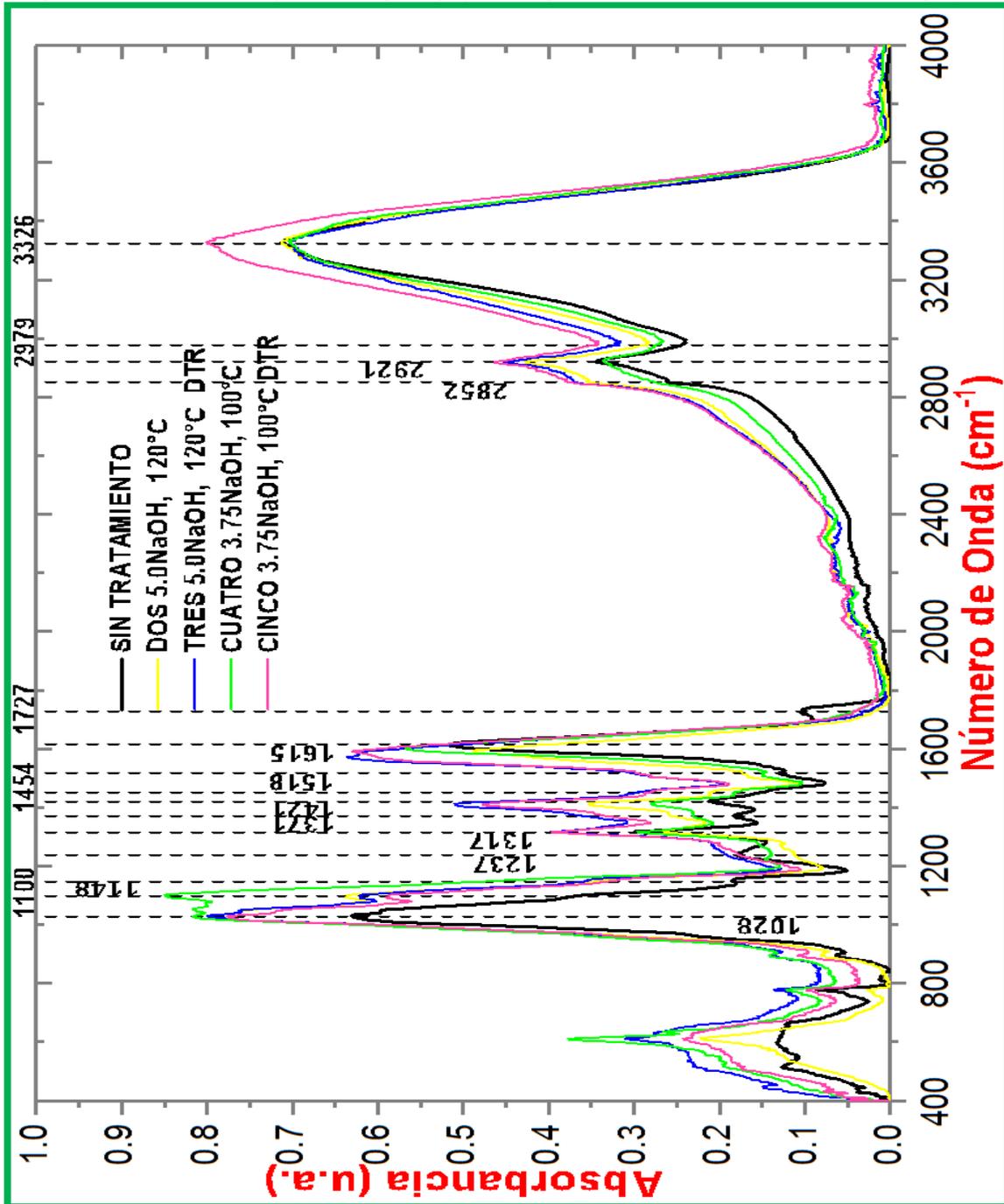
Así mismo, existen muestras con condiciones parecidas que no se localizan cercanas como UNO [7.50%|130°C] con DOS [5.00%|120°C], CUATRO [3.75%|100°C] con NUEVE [3.75%|70°C] y DOCE [3.75%|120°C|F] con TRECE [3.75%|150°C|F], de manera que se infiere que las condiciones de tratamiento independientes que se analizaron no fueron determinantes o no son los únicos factores en la modificación estructural del material y por consiguiente tampoco en la difracción de rayos X. De modo, que debe existir alguna otra variación en el pretratamiento que modifique la estructura y provoque la lejanía entre ellas ya sea propia del extrusor u externa como bombeo oscilante, formación de algún tapón, problemas de transferencia de calor y masa, temperatura ambiental, materia prima muy heterogénea, etc. También, es difícil distinguir patrones en el ACP que describan el rendimiento, debido a que se necesita un mayor número de experimentos, dentro de los diferentes grupos y en conjunto.

De contrastar las **gráficas de resultados 7 y 8**, se concluye que las técnicas de la determinación estructural de la celulosa como el índice de cristalinidad, desplazamiento del pico principal y la intensidad de picos específicos, proporcionan información útil que logra correlacionar las muestras y las propiedades que se reflejan en los difractogramas. Sin embargo, existen ciertas diferencias al observar las posiciones de las muestras, esto se debe a que no se está tomando en cuenta todas las señales que existen en los difractogramas, por lo que disminuye la capacidad de diferenciación entre las muestras como es el caso de la **gráfica de resultados 7**.

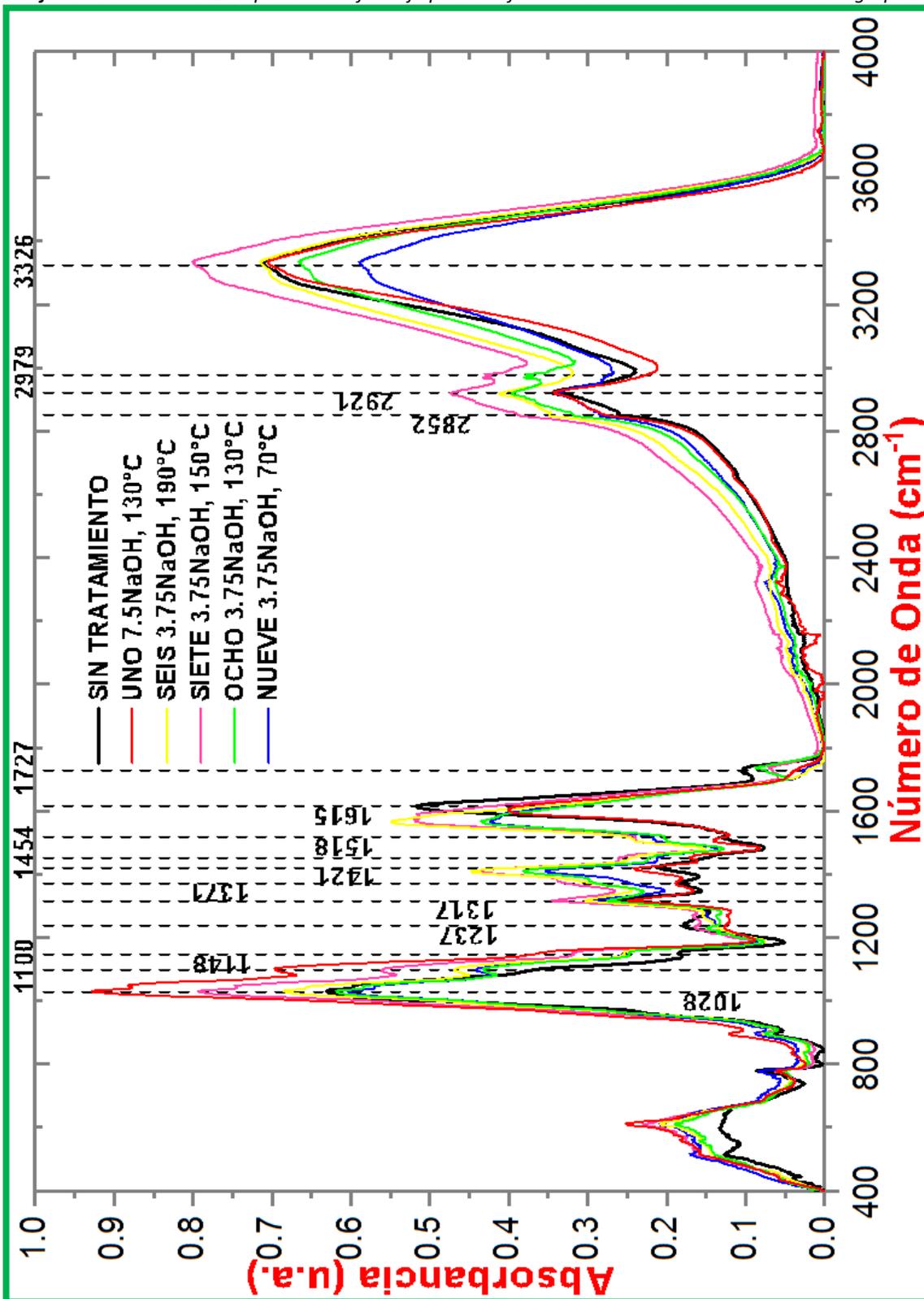
7.3. RESULTADOS DE LOS ESPECTROS POR FTIR

A continuación, los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier de las 13 muestras extrudadas y la muestra control SIN TRATAMIENTO (*Gráfica de resultados 11, 12 y 13*).

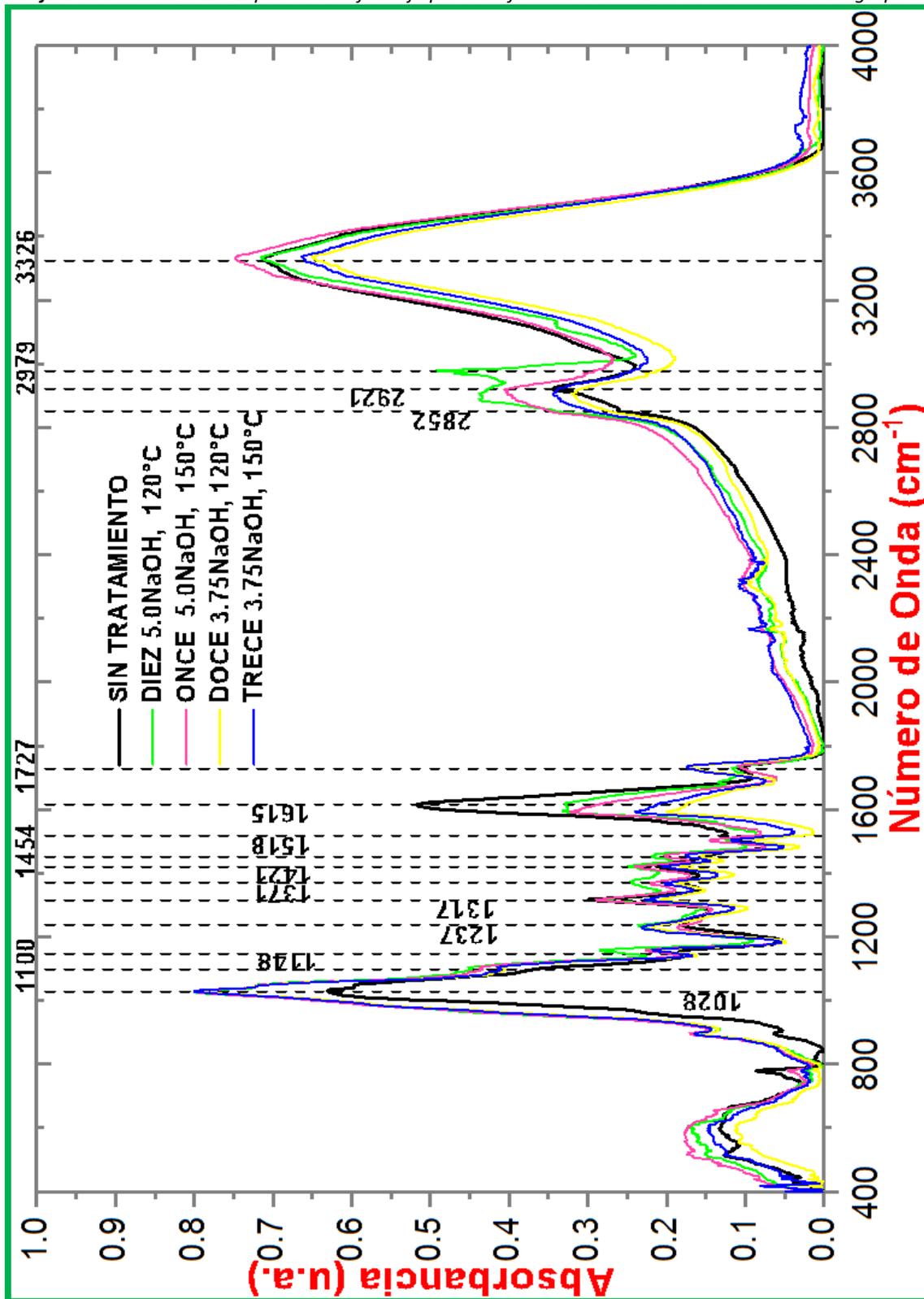
Gráfica de resultados 11: Espectro de infrarrojo por transformada de Fourier de las muestras del grupo A.



Gráfica de resultados 12: Espectro de infrarrojo por transformada de Fourier de las muestras del grupo B.



Gráfica de resultados 13: Espectro de infrarrojo por transformada de Fourier de las muestras del grupo C.



7.3-1 Análisis de los resultados de los espectros infrarrojos

De los espectros se utiliza una tabla que correlaciona las principales señales que identifican a varios grupos funcionales del material lignocelulósico (**Tabla 5**) y por medio de los cambios en sus intensidades, se realiza un análisis de las modificaciones que sufrieron estos diversos grupos funcionales en los 13 tratamientos y la muestra control.

Tabla 5: Designación de las principales bandas en el espectro FTIR del bagazo de agave y sus picos característicos más destacados.
(Oudiani, et al., 2017)

Principales bandas de IR	Señal más intensa (cm ⁻¹)	Fuente	Asignación de grupos funcionales a la banda
3200-2700	3326	Celulosa	Estiramiento de uniones O-H y puentes O...H
2938-2920	2921	Celulosa, Hemicelulosa	Estiramiento simétrico en C-H en grupos (metilos, metilenos) de cadenas laterales
2840-2835	2852	Celulosa Hemicelulosa	Estiramiento asimétrico en C-H en grupos (metilos, metilenos) de cadenas laterales
1745-1695	1727	Hemicelulosa Lignina	Los enlaces carbonilo (asociados con la remoción de la cadena lateral de la hemicelulosa y lignina)
1640-1590	1615	Lignina	Fenólicos de doblete de lignina cetónico (-C=O) y estiramiento C=C del anillo aromático (S)
1530-1480	1518	Lignina	Estiramiento C=C del anillo aromático (G)
1480-1440	1454	Hemicelulosa Lignina	Deformación y torsión asimétrico de metilenos y metoxilos -OCH ₃ ,
1440-1390	1421	Hemicelulosa Lignina	Deformación asimétrico en -OCH ₃
1390-1350	1371	Celulosa Hemicelulosa	Doblamiento de C-H en celulosa I y hemicelulosa.
1345-1295	1317	Celulosa	Bamboleo en el plano de CH en celulosa, doblamiento en el plano en O-H
1250-1200	1237	Lignina	Respiración del anillo siringil, estiramiento en C-O en lignina. Estiramiento asimétrico en éteres aromáticos o vinílicos
1186-1136	1148	Lignina Celulosa	Deformaciones aromáticas. Estiramiento antisimétrico de uniones de celulosa C-O-C.
1136-1086	1100	Celulosa Lignina	Deformación aromática de C-H en el plano, típico para unidades S. Estiramiento C=O en cetonas aromáticas. Deformación en alcoholes secundarios y éteres alifáticos.
1040-1015	1028	Celulosa Hemicelulosa	Estiramiento y vibración de C-O en celulosa y hemicelulosa

Análisis de la banda (3200-2700). Esta banda amplia e intensa indica la presencia de grupos hidroxilo y puentes de hidrógeno.

Esta banda representa los grupos hidroxilo y los puentes de hidrógeno, enlaces muy importantes, que se encuentran principalmente en la celulosa manteniéndola unida, pero que también se encuentran en la hemicelulosa y la lignina. Por lo que en un tratamiento, esta banda refleja tanto el grado de despolimerización de la celulosa con una mayor exposición y la liberación de grupos polares (-OH) (Oudiani, et al., 2017).

Del grupo A, la intensidad de este pico con respecto al control en las muestras DOS [5.00%|120°C], TRES [5.00%|120°C|R] y CUATRO [3.75%|100°C] no presentan un cambio aparente, lo que apunta a una pobre exposición o transformación de los grupos (-OH). Por el contrario, la muestra CINCO [3.75%|100°C|R] a pesar de tener condiciones suaves, el doble tiempo de residencia logró incrementar su intensidad, con lo que se atribuye a mayor número de grupos (-OH) expuestos a la superficie de las fibras (**véase anexo**), por una posible eliminación efectiva de hemicelulosa y lignina, que dan también como resultado un mayor carácter hidrofílico en las fibras (Simão, et al., 2016). Por otro lado, si se observa el ancho de la banda de todas las muestras del grupo A, se nota una mayor amplitud con respecto al control, lo que señala a grupos (-OH) expuestos e incremento hidrofílico en todas estas muestras, solo que en mayor proporción la muestra CINCO [3.75%|100°C|R].

Del grupo B, las muestras UNO [7.50%|130°C] y SEIS [3.75%|190°C], una con alta concentración de sosa y la otra de temperatura, no presentan un cambio aparente en la intensidad de este pico. La muestra OCHO [3.75%|130°C] y NUEVE [3.75%|70°C], con condiciones bajas de sosa y temperatura, presentan una disminución en la intensidad de esta señal, posiblemente porque solo se logra eliminar partes amorfas de hemicelulosa y lignina que pudieran interferir con la exposición de grupos (-OH) o simplemente no existe rupturas, ni libertad de movimiento en las fibras de la celulosa. Al mismo tiempo, la muestra SIETE [3.75%|150°C] si logra incrementar su absorbancia, lo que se atribuye a un mayor

número de grupos (-OH) expuestos de la superficie, mayor carácter hidrofílico o libertad de movimiento en los enlaces de las fibras de celulosa (Simão, et al., 2016). También, la amplitud de la banda del grupo B incrementa en comparación al control, excepto en la muestra UNO [7.50% | 130°C] que manifiesta un claro adelgazamiento de esta banda, lo que señala que una alta concentración de sosa provoca una ruptura excesiva de enlaces hidroxilo en sus componentes y menor carácter hidrofílico en sus fibras.

En el grupo C de los filtrados, es claro que debe disminuir esta banda con respecto al control, ya que al extraer el agua por el proceso de filtración, resulta en un extrudado con una menor humedad interna. Así mismo, la filtración no es selectiva y diversos componentes lignocelulósicos con grupos (-OH) son extraídos, lo que genera una disminución de esta banda. De modo que en el grupo C como en el grupo B, condiciones medianamente fuertes con una concentración de sosa del 5% y temperaturas de entre 120°C y 150°C, promueve la exposición de grupos (-OH) y el incremento hidrofílico, mientras que condiciones más suaves no consiguen una efectiva exposición de los grupos (-OH) ni un incremento en la capacidad hidrofílica y posiblemente cierta cantidad de compuestos amorfos libres provocan interferencia lo que genera una disminución en la intensidad del pico.

La muestra SIN TRATAMIENTO, la cual tiene una banda de gran intensidad, señala que no ha habido destrucción de celulosa ni hemicelulosa como en los materiales tratados, no obstante el grosor de la banda es menor a la del grupo A y B lo que confirma que el tratamiento provoca más exposición de la celulosa, el incremento de grupos hidroxilos libres y la capacidad hidrofílica (Simão, et al., 2016).

Un punto que hay que señalar es que a mayor cantidad de agua adsorbida dentro del material o incremento hidrofílico, mayor será su eficiencia en la hidrólisis, ya que facilita el transporte de las enzimas al interior del material (Vertès, et al., 2010).

Análisis de las bandas (2938-2920) y (2840-2835). Bandas relacionadas con el estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos metil, metilenos y metoxilos principalmente de la hemicelulosa.

El incremento de ambos picos se atribuye a la ruptura o liberación de grupos metoxilos, metilenos y metilos de la cadena lateral de grupos aromáticos, así como también un xilano más expuesto y con menor interacción con la celulosa (Oudiani, et al., 2017).

Existe una mayor intensificación de esta señal en condiciones con 5% de sosa, doble tiempo de residencia o temperaturas por arriba de los 150°C. Es decir, condiciones suaves en el proceso no consiguen liberar las cadenas laterales de los grupos aromáticos y por ende no se intensifican ambos picos como las muestras CUATRO [3.75% | 100°C], NUEVE [3.75% | 70°C], DOCE [3.75% | 120°C | F] y TRECE [3.75% | 150°C | F]. Pero, al mismo tiempo, condiciones muy agresivas como la muestra UNO [7.50% | 130°C] con una alta concentración de sosa posiblemente desencadena una fuerte descomposición o eliminación de estos grupos, lo que ocasiona el desplome en la intensidad de ambos picos en el espectro.

Un punto a señalar, es que se ha observado que en los compuestos inhibitorios entre mayor cantidad de grupos metoxilos contengan menor será la inhibición del compuesto en cuestión (Pan, 2008). Por otra parte, se advierte el surgimiento de una protuberancia en el número de onda 2979 cm^{-1} , esta tiene un gran parecido al pico sobresaliente que se observa en el espectro de la lignina pura (**véase anexo**), por lo que esta elevación que surge en las muestras SIETE [3.75% | 150°C], OCHO [3.75% | 130°C] y DIEZ [5.00% | 120°C | F] se podría atribuir a la liberación de monolignones que mantienen unida a los componentes lignocelulósicos sin su degradación total y que además su generación está relacionada con un incremento en el rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Análisis de la banda (1745-1695). Los enlaces carbonilo asociados con la remoción de la cadena lateral de la hemicelulosa y la lignina.

Este pico caracteriza ramificaciones con enlaces de grupos éster de acetilo de la hemicelulosa o grupos éster de carbonilo de la lignina, estiramientos de grupos ácidos carboxílicos (-COOH) de ácidos ferúlico y grupos acetil aromáticos del p-cumárico. La reducción en la intensidad de absorción podría atribuirse a la eliminación de polímeros de hemicelulosa y lignina durante el tratamiento (Simão, et al., 2016).

Este pequeño pico es removido por completo en las muestras del grupo A, posiblemente debido a alta concentración de sosa y doble tiempo de residencia. En el grupo B, la muestra SIETE [3.75% | 150°C], OCHO [3.75% | 130°C] no tuvieron una completa remoción de este pico. La permanencia de este pico también tiene una relación con un mayor rendimiento hidrolítico lo que podría significar que su eliminación se debe a una alta despolimerización de cadenas laterales que podrían inhibir a las enzimas. La muestra CUATRO [3.75% | 100°C] y NUEVE [3.75% | 70°C], con condiciones de tratamiento suaves, no presentaron este pico posiblemente se deba al débil tratamiento, que no logra romper estos enlaces de carbonilo y acilo de la hemicelulosa o de la lignina que envuelven y rodean a la celulosa, por lo que su libertad de movimiento se dificulta y la exposición de la celulosa se torna reducida.

En las muestra filtradas se sigue presentando este pico, inclusive con un aumento en su intensidad con respecto al control, como se observa en las muestras DOCE [3.75% | 120°C | F] y TRECE [3.75% | 150°C | F]. Este resultado puede significar que tanto la hemicelulosa como la lignina siguen conservando estas largas cadenas, pero con una mayor libertad de movimiento. Sin embargo, al aumentar la concentración de sosa al 5% como en las muestras DIEZ [5.00% | 120°C | F] y ONCE [5.00% | 150°C | F], se refleja una mayor ruptura y eliminación de estas uniones, pero gracias a la filtración quizás no se consigue efectuar una intensa inhibición ni obstrucción enzimática.

Análisis de la banda (1640-1590). Indica presencia de anillos aromáticos y el estiramiento C=C del anillo aromático en unidades del siringil.

Esta banda es característica de un pico muy intenso de lignina con estiramientos aromáticos (C=C) en unidades de siringil (Oudiani, et al., 2017). La eliminación de monómeros de lignina se ve reflejada con una reducción de esta banda debido a un tratamiento alcalino (Ferrer, et al., 2016). Al evaluar las muestras tratadas, contrario a una disminución de esta banda por la eliminación de lignina, se muestra un aumento en la intensidad de este pico con respecto al control en las muestras TRES [5.00%|120°C|R] y CINCO [3.75%|100°C|R] con doble tiempo de residencia, pero una disminución en la muestra DOS [5.00%|120°C] que quizás no consiguió remover los enlaces o quizás resultó en una fuerte descomposición. Estos resultados señalan un indicio de que el tratamiento alcalino si provoca la despolimerización de la lignina, pero el doble tiempo de residencia logra penetrar aún más sobre el material y exponer o liberar estos anillos aromáticos de la lignina que se encontraban inmersos en el material (**véase anexo**).

Las muestras del grupo B presentan también indicios de la despolimerización de la lignina, pero en condiciones más agresivas de temperatura existe mayor intensidad del pico que en condiciones de tratamiento menos agresivas, lo que señala que las muestras OCHO [3.75%|130°C] y NUEVE [3.75%|70°C] desintegra componentes de la lignina, pero las muestras SEIS [3.75%|190°C] y SIETE [3.75%|150°C] consiguen exteriorizar estos componentes y desvincularlos de otros componentes con lo que consiguen una mayor libertad de movimiento, haciendo esta banda más visible. Por otro lado, la muestra UNO [7.50%|130°C] manifiesta una gran desplome de la banda y evidencia una gran destrucción de este complejo polimérico aromático por una severa descomposición.

En el grupo C de filtrados se encuentra notoriamente disminuida su intensidad debido a la filtración. Las muestras DIEZ [5.00%|120°C|F] y ONCE [5.00%|150°C|F] con tratamiento más agresivo presentan un pico más intenso que las muestras DOCE [3.75%|120°C|F] y

TRECE [3.75% | 150°C | F] esto puede interpretarse como el mismo caso del grupo B, en el que el remanente de lignina se expresa más intensamente con un tratamiento más fuerte que permite penetrar más profundamente sobre el material y genera mayor libertad del compuesto. Un detalle interesante es que el pico se traslada a una menor frecuencia cuando experimenta el tratamiento, lo que revela modificaciones de estos compuestos aromáticos.

Análisis de la banda (1530-1480). Estiramiento (C=C) del anillo aromático en unidades de guaiacil.

Esta banda representa el estiramiento de la lignina pero en particular de enlaces (C=C) en unidades de guaiacil (Oudiani, et al., 2017). Esta es una banda más pequeña y se traslapa con la banda anterior, así mismo el porcentaje de anillos guaiacil es menor al de los anillos siringil en el bagazo de agave (Rahikainen, et al., 2011).

El comportamiento de absorción es similar al de la banda anterior, es decir, a condiciones más agresivas se emite una mayor absorbancia en el espectro, excepto en la muestra UNO [7.50% | 130°C] con una concentración de sosa muy elevada. Pero a diferencia de la banda anterior, todas las muestras del grupo A y B presentan un incremento en la intensidad con respecto al control, este efecto insinúa que las unidades guaiacil tienen una mayor exposición y libertad de movimiento por el tratamiento. En el grupo C existe la disminución de la banda en comparación al control, gracias que se extrae parte de la lignina del material tras el proceso de filtración.

Análisis de la banda (1480-1440). Bandas relacionadas con la torsión y deformación de grupos metileno y metoxilos principalmente de lignina.

Esta banda es semejante a la de (2938-2920), que representan la liberación de grupos metileno y metoxilos (Obi, et al., 2012). Pero en contraste con la banda anterior esta no se elimina con la filtración e inclusive es mejor definida. Es decir, el tratamiento expone y

permite una mayor vibración de los grupos metilenos o metoxi que siguen aún presentes después del tratamiento.

Análisis de la banda (1440-1390). Deformación asimétrico en los grupos funcionales metoxi (-O-CH₃) de la lignina y la hemicelulosa.

Interpreta el mismo concepto de la banda anterior pero contemplando a los grupos metoxi de la hemicelulosa (Oudiani, et al., 2017). La hemicelulosa presenta también un alto contenido metoxi, por lo que un incremento en la intensidad se define como un incremento también en la exposición de cadenas de xilano libres, disminuyendo así las interacciones de estas fibras hacia la celulosa y como se mencionó anteriormente entre más metoxilos contiene un monómero aromáticos, menor capacidad de inhibición (Ximenes, et al., 2010).

Las muestras con condiciones más agresivas tienen un pico muy intenso TRES [5.00%|120°C|R], CINCO [3.75%|100°C|R], SEIS [3.75%|190°C], SIETE [3.75%|150°C], excepto en la muestra UNO [7.50%|130°C] que debido a su alta concentración de sosa, elimina los grupos metoxi por una fuerte descomposición de lignina y hemicelulosa, dando a lugar a compuestos de menor peso molecular.

La intensidad de absorción de esta banda con tratamientos más suaves no es tan fuerte como se puede observar en las muestras CUATRO [3.75%|100°C], OCHO [3.75%|130°C], NUEVE [3.75%|70°C], DOCE [3.75%|120°C|F] y TRECE [3.75%|150°C|F]. Esto señala que existe una reducida despolimerización de las cadenas laterales con grupos metoxi y permanecen aun formando una red. Asimismo, la absorción en el grupo de los filtrados se redujo, lo que infiere que este proceso extrae componentes con grupos metoxi.

Análisis de las bandas (1390-1350) y (1345-1295). Doblamiento del grupo (-CH₂) en celulosa y hemicelulosa. Bamboleo en el plano de los grupos (-CH) en la celulosa y doblamiento en el plano de (-OH).

Estas bandas representan el movimiento de (-CH₂) en celulosa y hemicelulosa, pero particularmente la banda de (1345-1295) es característico de la celulosa tipo I (Haque, et al., 2013). Estas bandas por lo tanto muestran incremento en la exposición de la celulosa y el xilano, de modo que entre más intensa sea su absorción, se reduce el impedimento estérico y existe una mayor posibilidad de un efectivo rendimiento hidrolítico. En especial las muestras con doble tiempo de residencia, la muestras SIETE [3.75%|150°C] y DIEZ [5.00%|120°C|F] fueron las que alcanzaron un incremento en la absorción de estos picos. Por otra parte si se observa el espectro de la lignina existe un traslape de la celulosa y la hemicelulosa, por lo que los resultados pueden no definirse con exactitud (véase anexo).

Análisis de la banda (1250-1200). Respiración del anillo siringil y estiramiento en (C-O) en lignina. Estiramiento asimétrico en éteres aromáticos o vinílicos.

Los enlaces aril-alquil éter (ar-C-O-C-al) en la lignina se identifican en esta banda y desaparecen gradualmente con una mayor concentración de NaOH (Zulkiple, et al., 2016). Esto sugiere que el tratamiento con NaOH muestra una posible deslignificación a través de la interrupción de estos enlaces de éter entre la lignina y los carbohidratos (Haque, et al., 2013).

En las muestras del grupo A, la muestra DOS [5.00% | 120°C] mostró una severa destrucción de estos enlaces, pero curiosamente el tratamiento con doble tiempo de residencia en las muestra TRES [5.00% | 120°C | R] y CINCO [3.75% | 100°C | R] obtienen una mayor absorbancia lo que señala la exposición o liberación de estos grupos que posiblemente están inmersos dentro del material, sin llegar a una descomposición (véase anexo). La disminución de esta banda en la muestra CUATRO [3.75%|100°C] es menor comparada con muestras con tratamientos del 5% de sosa, por lo que posiblemente si se logró romper estos enlaces y que pueden ser partícipes de una alta acción inhibitoria.

Así mismo, este pico no señala una diferencia notable al incrementar la temperatura, es decir, las uniones (ar-C-O-C-al) no son sensibles a una modificación por la temperatura. Pero

se observa la disminución de la banda con respecto al control gracias a la concentración de sosa 3.75% y un mayor desplome en la intensidad con concentraciones por arriba del 5%.

Curiosamente en el grupo de los filtrados esta banda obtuvo una mayor y más definida absorción, posiblemente se debe a la eliminación de componentes que interfieren en la intensidad o una mayor libertad de movimiento. No obstante la muestra ONCE [5.00% | 150°C | F] con tratamiento más agresivo claramente se reduce esta señal.

Análisis de las bandas (1186-1136) y (1136-1086). Deformación aromática de (C-H) en el plano, típico para unidades siringil. Estiramiento (C=O) en cetonas aromáticas. Deformación en alcoholes secundarios y éteres. Estiramiento antisimétrico en uniones (C-O-C) glucosídicos de la celulosa.

Estas bandas aparecen después del pretratamiento con NaOH y representan el estiramiento de (-CO) en la unidad siringil de lignina. Su disminución implica que la lignina macromolecular se degrada a algunas sustancias moleculares pequeñas que son solubles en agua después del pretratamiento con NaOH. Esto podría explicar la razón por la cual la cantidad de extractos aumenta después de un tratamiento con NaOH (He, et al., 2009)

Estas bandas que representan tanto la lignina como la celulosa, un incremento en la intensidad de los picos puede significar tanto mayor exposición y libertad de la celulosa como de la lignina libre. Las muestras DOS [5.00% | 120°C], TRES [5.00% | 120°C | R] y CINCO [3.75% | 100°C | R] obtuvieron un incremento de intensidad muy similar en las bandas. Por otro lado, un repunte en la intensidad del pico en la muestra CUATRO [3.75% | 100°C] hace inferencia del surgimiento de una gran cantidad de grupos aromáticos muy inhibitorios como unidades de cetonas que provocaron un bajo rendimiento hidrolítico.

Las muestras del grupo B también experimentan un similar incremento en la intensidad pero en menor proporción a las muestras del grupo A, ya que a menor concentración de

sosa menor cantidad de transformación en la red de polímeros. Por otra parte, la banda de las muestras del grupo C es menor a las muestras del grupo A y B, señalando que la filtración extrae sustancias con estos grupos funcionales. Sin embargo, todas las muestras presentan mayor absorción a la muestra control, lo que representa una mayor libertad de movimiento en estos grupos.

Análisis de la banda (1040-1015). Deformación fuera de fase de aromáticos (C-H) y (C-O) de la celulosa, vibración del anillo pyran y uniones β -glucosídicos.

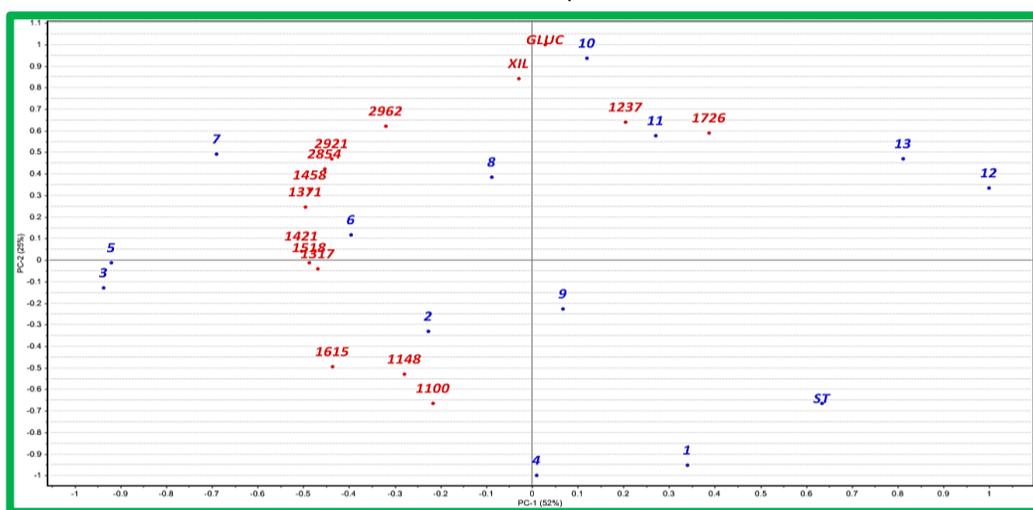
Esta señal está asociada con la celulosa típica y al aumentar la concentración de NaOH en el tratamiento la intensidad de su absorbancia se incrementa gradualmente. Las señales más altas provinieron de fracciones celulósicas más libres y expuestas, lo que provoca un incremento en la probabilidad de un ataque enzimático y por ende en el rendimiento hidrolítico (Haque, et al., 2013).

Esta banda es un indicador que determina la efectividad del tratamiento, por lo que la muestra SIN TRATAMIENTO es mucho menor en comparación a las demás muestras. Las muestras del grupo A y C mostraron una similar intensidad en sus absorbancias. La muestra UNO [7.50% | 130°C] señala una alta intensidad de esta banda, debido a una mayor libertad de las fibras de la celulosa por las rupturas de redes de lignina y hemicelulosa.

Las muestras del grupo B no presentaron un gran incremento en la absorción, en especial las que experimentaron condiciones suaves como OCHO [3.75% | 130°C] y NUEVE [3.75% | 70°C], ya que la exposición y la libertad de movimiento de la celulosa es pobre. Sin embargo, el mismo comportamiento debió de existir en la muestra CUATRO [3.75% | 100°C], por lo que debe de existir otros factores ajenos a la celulosa que modifiquen la intensidad de la banda, además de que probablemente existe el traslape de otras bandas como de la lignina que se encuentran muy cercanas a esta frecuencia.

Para finalizar se realizó el análisis de componentes principales de los principales picos (**Gráfica de resultados 14**). Esta gráfica explica la varianza de los resultados en un 81% y se eliminaron picos que aportaban una correlación menor al 50%. Se observa una pequeña similitud en la localización de las muestras del análisis de difracción de rayos X, sin embargo, existe mayor separación entre ellas lo que indica que los espectros de infrarrojo aportan más información para identificar diferencias en los tratamientos.

Gráfica de resultados 14: ACP entre las diferentes muestras y la intensidad de sus principales picos característicos de los espectros de FTIR.



El grupo C de los filtrados se encuentra en el primer cuadrante, apartado de los demás ya que la extracción del agua genera características especiales en este grupo. Las muestras con mayor rendimiento hidrolítico se reflejan al incrementar el número del componente principal dos. El proceso de doble tiempo de residencia provoca semejanzas en los grupos funcionales que presentan este proceso. Finalmente las muestras con bajo rendimiento en la hidrólisis se localizan en el cuarto cuadrante las cuales son las muestras SIN TRATAMIENTO, UNO [7.50% | 130°C], CUATRO [3.75% | 100°C] y NUEVE [3.75% | 70°C].

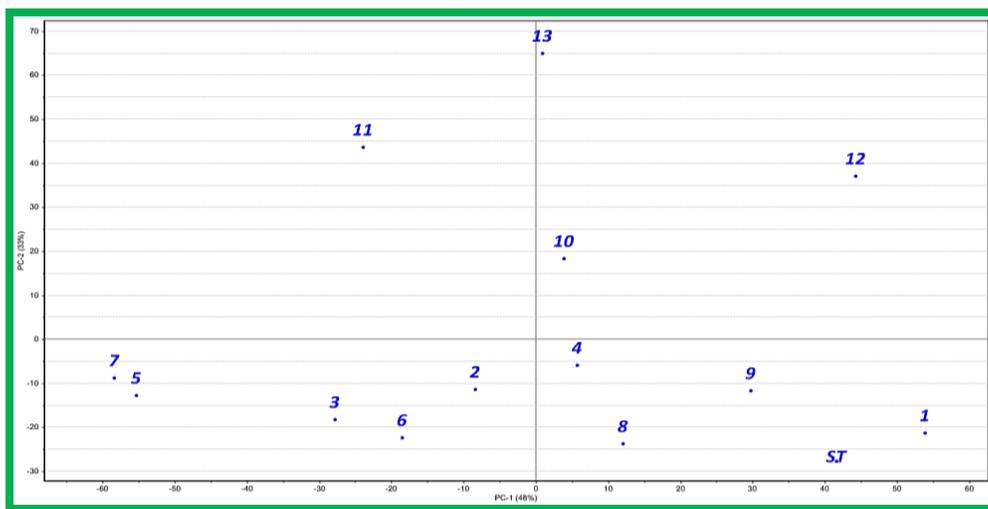
Como se sabe, en el ACP entre más alejadas este una muestra de la otra o de sus resultados, mayor diferencia entre estas. De modo que las muestras con un efectivo tratamiento y desempeño hidrolítico, se encuentran más próximas al incremento de los picos **1726** y **1237** (que caracterizan una mayor libertad de grupos éster) y los picos **1371**, **1458**, **2854**, **2921**,

2962 (que caracterizan el doblamiento (-CH₂) en celulosa y hemicelulosa, estiramientos de grupos metil, metilenos, metoxilos y doblamientos de grupos (-OH).

Por otra parte, los picos **1100**, **1148** y **1615** se ubican cerca de las muestras con bajo rendimiento hidrolítico. Estos picos característico de cetonas aromáticas, alcoholes y éteres alifáticos son prueba de un mayor porcentaje de sustancias inhibitorias, que afectan el desempeño en las enzimas (Ximenes, et al., 2010).

Se realizó al igual el ACP del espectro de FTIR de cada una de las señales de absorción entre (900 cm⁻¹ a 3800 cm⁻¹), que se simplifican a 2903 señales significativas de absorción y explican la variación de los resultados en un 81% (**Gráfica de resultados 15**). Así mismo, esta gráfica muestra diferencias con la gráfica anterior, por lo que indica que el análisis únicamente de los picos principales no es un buen estimado para correlacionar las muestras y falta tomar en consideración las áreas de las bandas.

Gráfica de resultados 15: ACP entre las diferentes muestras a través de la totalidad de las absorbancias en los espectros de FTIR.



Se observa una separación en el componente principal dos de las muestras filtradas y las no filtradas. Por otro lado, las muestras del cuadrante cuatro son identificadas como las que obtuvieron menor rendimiento en la hidrólisis. Las muestras SIETE [3.75% | 150°C] y CINCO [3.75% | 100°C | R] presentaron un gran parecido, por lo que podría inferirse que el aumento

de la temperatura provoca cambios similares a un proceso de doble tiempo de residencia con condiciones suaves en sus grupos funcionales.

El componente principal uno separa las muestras con un tratamiento con condiciones más agresivas de las menos agresivas. Se localizan en el componente uno con signos positivo a las muestras con tratamiento menos agresivo, excepto en la muestra UNO [7.50% | 130°C], que por su alta concentración de sosa provoca que muchos de los grupos funcionales se descompongan y en consecuencia la absorbancia que caracteriza al grupo funcional disminuya, haciéndose ver como un tratamiento suave.

En resumen, la técnica de FTIR tiene gran capacidad de predicción y caracterización de las diferentes muestras para analizar los diferentes tratamientos. Un incremento en la intensidad y la amplitud de la banda **3326**, que identifica a los puentes de hidrógeno y grupos hidroxilo, señala mayor exposición interna de las interacciones de la celulosa y capacidad de absorción de agua. Asimismo, el incremento de absorción de las bandas **1317**, **1371** y **1028**, que caracteriza una mayor manifestación de la celulosa y la hemicelulosa, se correlaciona a un menor impedimento en el transporte de enzimas hacia la celulosa.

En el caso de muestras no filtradas, la intensidad de los picos característicos de lignina de (1400 cm^{-1} a 1800 cm^{-1}) se intensifican y señalan una despolimerización que genera mayor libertad de este polímero. Por otra lado, la disminución de estas señales, como en la muestra UNO [7.50% | 130°C], indica la eliminación de estos grupos o compuestos en el polímero a otros de menor peso molecular y posiblemente con efectos más inhibitorios en la hidrólisis y fermentación (Mitchell, et al., 2014). Por otro lado, el proceso de filtración reduce la absorción de estas señales, limitando así el poder inhibitorio y la obstaculización en el transporte de enzimas.

7.4. RESULTADOS DE LOS CROMATOGRAMAS POR HPLC

A continuación, se muestra un ejemplo de cromatograma del hidrolizado de la muestra control (**Gráfica de resultados 16**), que se asemeja a los diferentes cromatogramas que se utilizaron para la determinación de concentraciones de diferentes compuestos inhibitorios (**Tabla 6**) presentes en los hidrolizados de seis muestras pretratadas, los filtrados y su control.

Gráfica de resultados 16: Cromatograma del HPLC de la muestra sin tratamiento y sus resultados.

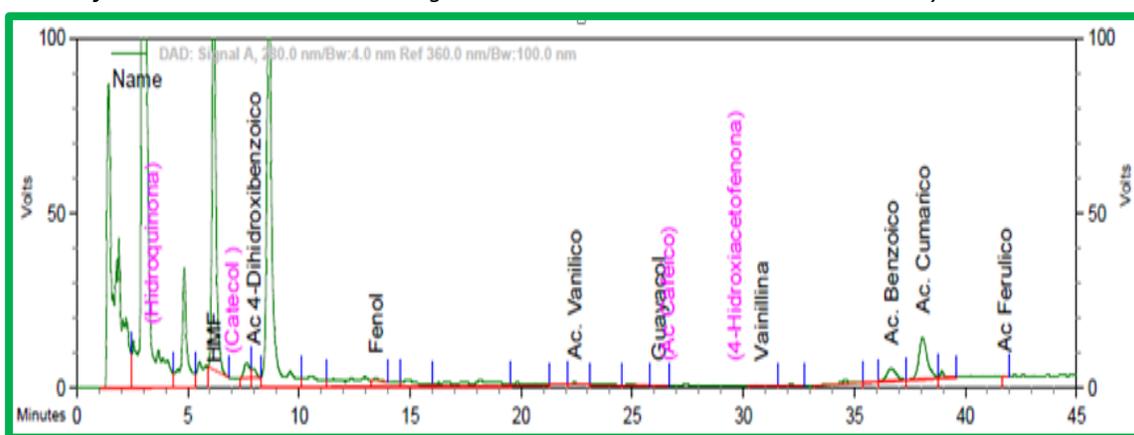


Tabla 6: Concentración de inhibidores en las muestras hidrolizadas, los filtrados y su control (mg/L).

		HMF	Catecol	Ácido 3,4-Dihidroxibenzoico	Fenol	Ácido Vanílico	Ácido Cafeico	Guayacol	4-Hidroxi acetofenona	Vainillina	Ácido Benzoico	Ácido Cumárico	Ácido Ferulico	Ácido Sinapico
SIN TRATAMIENTO	Promedio	20.66	0.00	2.87	3.06	0.85	ND	ND	ND	0.38	33.80	11.62	0.13	0.17
TRES [5.0NaOH, 120°C, DTR]	Promedio	1.79	ND	49.40	23.23	3.36	0.79	0.34	0.09	0.30	42.12	16.71	0.25	0.28
	SD	0.004	ND	0.073	0.039	0.014	0.010	0.003	0.001	0.004	0.275	0.028	0.005	0.017
CINCO [3.75NaOH, 100°C, DTR]	Promedio	3.61	1.08	83.58	15.83	2.93	0.06	0.93	0.11	1.97	45.07	15.08	0.22	0.25
	SD	0.021	0.006	0.416	0.155	0.035	0.001	0.011	0.003	0.008	0.425	0.003	0.005	0.005
SEISE [3.75NaOH, 190°C]	Promedio	2.64	0.38	70.67	11.34	1.87	0.86	1.01	0.05	1.71	46.68	15.03	0.95	0.22
	SD	0.000	0.007	0.042	0.082	0.018	0.083	0.008	0.001	0.026	0.047	0.043	0.014	0.004
SIETE [3.75NaOH, 150°C]	Promedio	3.04	0.38	70.51	12.30	2.02	0.72	1.01	0.05	1.46	48.00	15.67	0.35	0.21
	SD	0.003	0.001	0.047	0.028	0.004	0.002	0.031	0.002	0.003	0.563	0.002	0.009	0.004
OCHO [3.75NaOH, 130°C]	Promedio	3.43	0.27	77.58	15.80	2.39	0.09	0.16	0.05	1.45	51.59	17.66	0.23	0.39
	SD	0.001	0.002	0.026	0.067	0.027	0.002	0.000	0.000	0.006	0.077	0.015	0.001	0.025
NUEVE [3.75NaOH, 90°C]	Promedio	3.59	0.15	62.96	14.73	1.76	0.73	0.85	0.02	1.32	49.88	16.90	0.28	0.20
	SD	0.022	0.000	0.083	0.022	0.000	0.014	0.023	0.000	0.016	0.267	0.013	0.032	0.001
DIEZ [5.0NaOH, 120°C]	Promedio	7.22	0.55	49.54	1.76	1.40	0.06	0.16	0.02	1.38	51.89	19.30	0.17	0.27
	SD	0.02	0.00	0.13	0.04	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.56	0.00	0.00	0.00
ONCE [5.0NaOH, 150°C]	Promedio	5.84	0.81	61.72	4.32	1.62	0.03	0.16	0.02	1.80	52.99	18.51	0.23	0.38
	SD	0.070	0.033	1.844	0.101	0.083	0.000	0.000	0.000	0.001	0.167	0.004	0.007	0.004
DOCE [3.75NaOH, 120°C]	Promedio	5.04	0.32	43.54	2.22	0.54	0.17	0.72	0.02	0.93	42.96	15.52	0.16	0.17
	SD	0.021	0.007	0.159	0.003	0.011	0.005	0.020	0.000	0.012	0.201	0.040	0.002	0.000
TRECE [3.75NaOH, 150°C]	Promedio	4.95	0.48	52.42	2.46	1.14	ND	ND	ND	1.05	43.85	16.40	0.18	0.20

7.4-1 Análisis de los resultados de las concentraciones de los compuestos inhibitorios

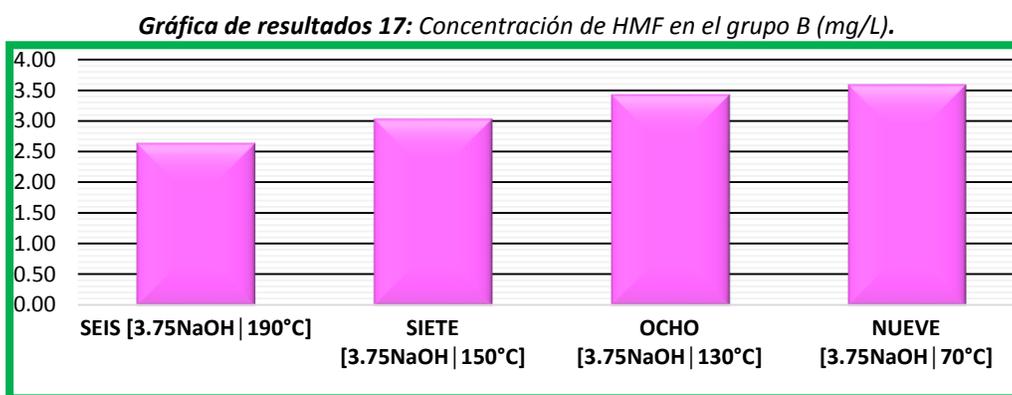
Se analizan los resultados de los trece diferentes inhibidores que se valoraron por medio del HPLC (**Tabla 6**) y se explica la razón de las diferentes concentraciones en las muestras. Cabe recordar, que la evaluación de las muestras TRES [5.00%|120°C|R], CINCO [3.75%|100°C|R], SEIS [3.75%|190°C] a NUEVE [3.75%|70°C] y la muestra SIN TRATAMIENTO, se realizaron sobre el sobrenadante de los hidrolizados y la evaluación sobre las muestras DIEZ [5.00%|120°C|F] a TRECE [3.75%|150°C|F] se realizaron sobre el filtrado que se extrajo del módulo seis en el extrusor al momento del pretratamiento.

Las causas de la inhibición de las enzimas celulolíticas incluyen inhibición por sustrato, por producto, resistencia a la transferencia de masa, efectos del tamaño de partícula y la unión de enzima no productiva con lignina que van desde concentraciones de μM a mM (Ximenes, et al., 2010). Algunos compuestos con el grupo funcional aldehído como: 4-hidroxibenzaldehído, coniferil aldehído, siringaldehído y vainillinas, inhiben a la mayoría de las levaduras a concentraciones incluso menores a 10 mM . Pero, en particular el furfural y el HMF (hidroximetilfurfural), productos que se forman en un medio ácido a partir de la hidrólisis de hexosas y pentosas con temperaturas de entre 100°C, reducen el crecimiento celular y las tasas de producción de etanol de las levaduras incluido *Saccharomyces cerevisiae* a concentraciones muy bajas (Vertès, et al., 2010) .

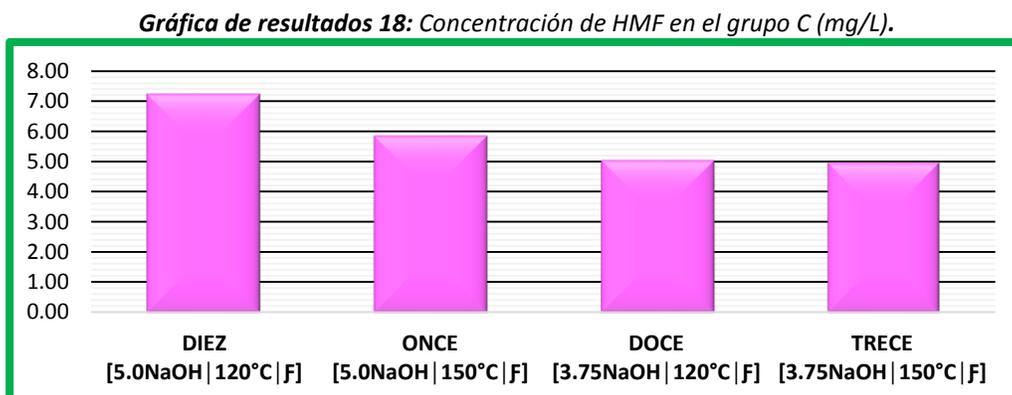
El hidroximetilfurfural (HMF) concebido como uno de los compuestos con mayor potencial de inhibición en la fermentación, se observa una concentración de 20.66 mg/L en la muestra SIN TRATAMIENTO, concentración notablemente más alta en comparación con las demás muestras. Posiblemente este compuesto se genera en el proceso de extracción de azúcares de la piña agave al producir tequila y se desprende fácilmente en la hidrólisis enzimática al introducirlo directamente a un medio ácido débil con una temperatura de 50°C o se genera directamente al llevar a cabo la hidrólisis enzimática. Pero al momento de llevar a cabo el

pretratamiento, quizás el componente HMF disminuye resultado de su degradación a furfural u otros compuestos de menor peso molecular.

En el grupo B, el HMF se presenta en mayores concentraciones en tratamiento con menores temperaturas (**Gráfica de resultados 17**). La tendencia de la gráfica, probablemente se deba a que el compuesto está presente en todas las muestras, pero al rebasar un límite de temperatura este se empieza a degradar, generando sustancias más tóxicas y con menor peso molecular como lo es el furfural o el ácido levulínico.

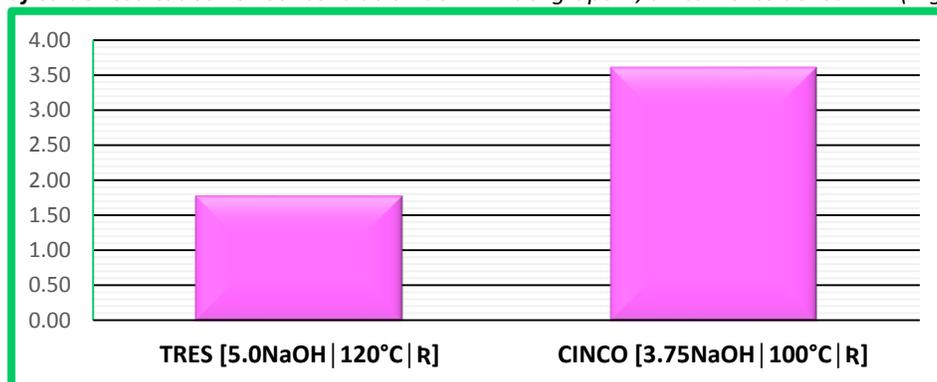


También, en el grupo C de los filtrados se obtiene la misma tendencia en la que a menores temperaturas existe mayor concentración de HMF (**Gráfica de resultados 18**). Sin embargo, un mayor porcentaje de sosa provoca el desprendimiento de más cantidad de HMF del extrudado, mientras que muestras con concentraciones de 3.75% de sosa quizás no logra desprender más cantidad de este compuesto.



Igualmente se caracterizó al grupo A, pero únicamente las muestras con doble tiempo de residencia (**Gráfica de resultados 19**). Esta gráfica también señala la misma tendencia de los grupos anteriores, en la que a menores temperaturas existe mayor cantidad de HMF, confirmándose aún más el planteamiento en que este compuesto es liberado fácilmente a bajas temperaturas y se descompone en tratamiento más agresivos.

Gráfica de resultados 19: Concentración de HMF del grupo A, únicamente de los DTR (mg/L).



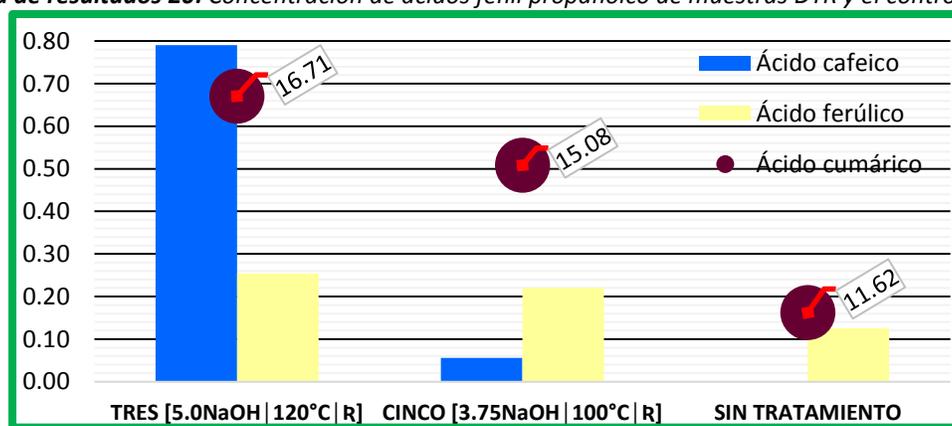
Resumiendo, la concentración del compuesto HMF disminuye gracias al tratamiento del extrusor. Sin embargo, la transformación del HMF en otros compuestos de menor peso molecular podrían también fungir como potentes inhibidores, por lo que es necesario realizar nuevas investigaciones que los detecten. En cuanto a los resultados de la vainillina y el 4-hidroxibenzaldehído (último no se muestra), compuestos tóxicos y también con un aldehído como grupo funcional, se forman en condiciones de tratamiento más agresivos, pero se encontraron en una concentración menor a 2.0 mg/L, por lo que se decidió no presentarse.

Otros ejemplos de compuestos aromáticos tóxicos son los ácidos de fenil propano, que inhiben severamente la productividad del etanol a bajas concentraciones en *S. cerevisiae* (Vertès, et al., 2010), por ejemplo el ácido ferúlico inhibe a esta levadura desde una concentración menor al 1.0 mM (Jönsson & Martín, 2016) y su efecto inhibitor puede ocurrir a concentraciones con dos orden de magnitud más bajas que las de los ácidos carboxílicos

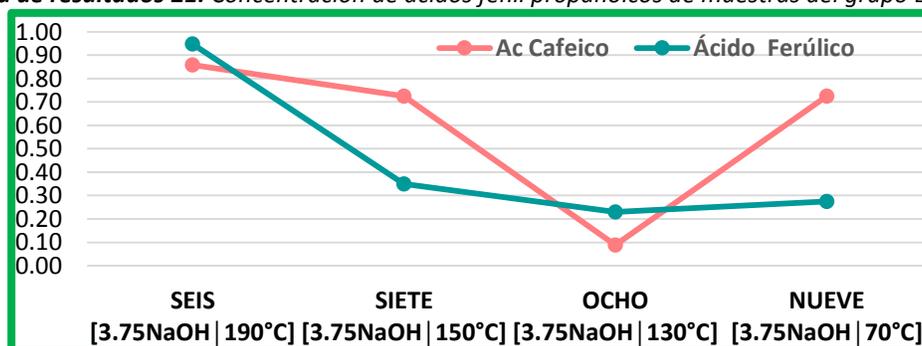
alifáticos como el ácido acético, fórmico y levulínico. Así, aunque las concentraciones presentes en el material son mucho más bajas que las de los ácidos alifáticos, los efectos inhibidores de estos ácidos aromáticos son mucho más fuertes. Sin embargo, se ha observado que un mayor número de sustituyentes metoxi disminuye la toxicidad de los compuesto aromáticos en *S. cerevisiae* y se concluye que cuanto más hidrofóbico es el compuesto más evidente la inhibición en la productividad del etanol (Mitchell, et al., 2014).

Debido al alto impacto inhibitorio de los ácido fenil propanoico por su grupo hidroxilo y su grupo ácido carboxílico, se eligieron medir el ácido p-cumárico, el ácido caféico y el ácido ferúlico, que además ha sido comprobado ser estos los causantes de adherencia y desactivación de enzimas hidrolíticas (Pan, 2008). Se observó una tendencia en el incremento de estos inhibidores, tras experimentar un aumento en las condiciones de tratamiento (Gráfica de resultados 20, 21 y 22).

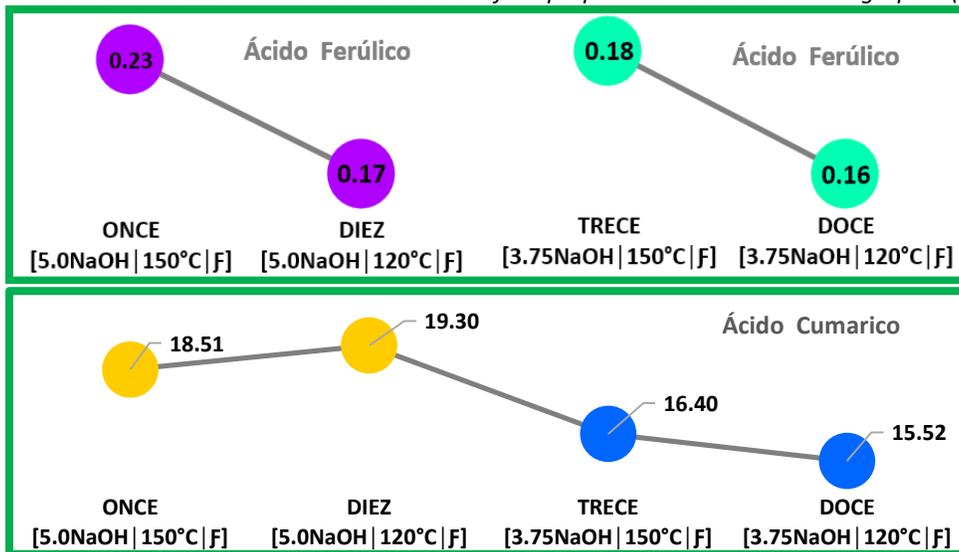
Gráfica de resultados 20: Concentración de ácidos fenil propanoico de muestras DTR y el control (mg/L).



Gráfica de resultados 21: Concentración de ácidos fenil propanoicos de muestras del grupo B (mg/L).



Gráfica de resultados 22: Concentración de ácidos fenil propanoicos de muestras del grupo C (mg/L).



Como se puede advertir en las tres gráficas anteriores, estos compuestos son más susceptibles a formarse en condiciones más altas de temperatura y concentración de sosa. Sin embargo, existen datos del ácido cumárico que no cumplen con esta tendencia por diversos factores, desde la misma heterogeneidad del bagazo de agave a la entrada del extrusor hasta variaciones en el pretratamiento que están fuera del alcance de control en el experimento.

No obstante el ácido ferúlico, en otra prueba que no se muestra, presentó concentraciones del orden de 50 mg/L. Este resultado posiblemente se deba un posible error tras aumentar el número de componentes en este análisis o la hidrólisis enzimática de la última prueba no fue tan efectiva, sin embargo, la relación de concentraciones entre las muestras permanece similar, por lo que cabría efectuar de nuevo el análisis de este compuesto. Por otro lado el ácido caféico, el ácido vanílico y ácido sinápico mostraron una concentración menor a 5.0mg/L, lo que demuestra que es poco probable que sean estos compuestos los causantes de inhibición tanto para la hidrólisis como para la fermentación.

Otro ácido aromático identificado con un alto potencial tóxico, que además se encuentra en altas concentraciones es el ácido 3-4 dihidroxibenzoico o ácido protocatechuic (**Gráfica de resultados 23**). Una posibilidad de la procedencia de esta sustancia es a través de extractos fenólicos derivados de la lignina, ya que sus sustituyentes son equivalentes a las posiciones del guayacilo y su desmetilación durante la hidrólisis provoque la formación del ácido protocatechuic y otros derivados de catecol que se encuentran en los hidrolizados. También, se ha informado que los ácidos dihidroxibenzoicos se forman cuando se calientan soluciones acuosas de azúcares ligeramente ácidas y es posible que se formen compuestos fenólicos a partir de azúcares derivados de la hidrólisis de polisacáridos (Jonsson, et al., 1998).

Gráfica de resultados 23: Concentración de ácido 3-4 dihidroxibenzoico (mg/L).



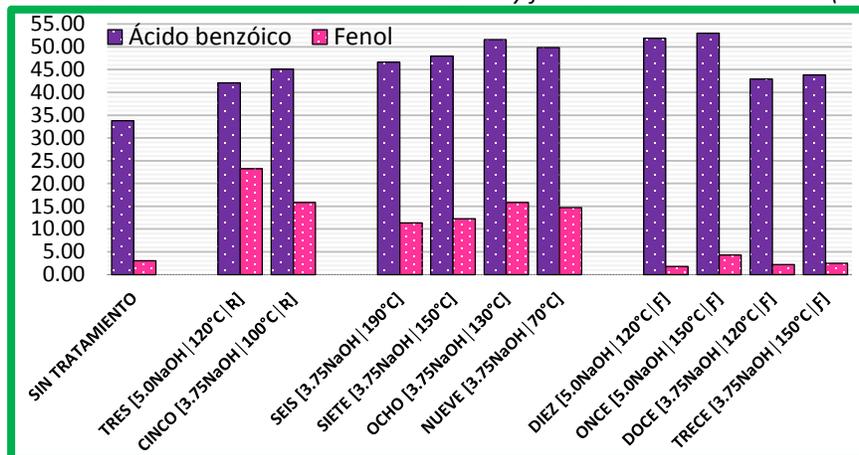
De esta última gráfica, el compuesto en la muestra SIN TRATAMIENTO aparece con una muy reducida concentración, lo que indica que es necesario que el material sea sometido al tratamiento para que este compuesto sea liberado.

En el grupo C de los filtrados se muestra un incremento del ácido 3-4 dihidroxibenzoico debido principalmente a una elevación de temperatura y en menor medida al porcentaje de sosa. Por el contrario, en las muestras del grupo A y B, se percibe mayor cantidad del compuesto en muestras con mayor rendimiento hidrolítico. La posible razón en el incremento de este compuesto se debe a una mayor accesibilidad dentro del material

durante el proceso de hidrólisis, es por eso que las muestras con mejor rendimiento presentan una elevación en la cantidad de la sustancias.

Continuando con el análisis de inhibidores, se evaluó el fenol y el ácido benzoico, sustancias tóxicas, de bajo pesos moleculares, pH dependientes y poco solubles en agua, que han sido detectados por generar una inhibición del 89% en la fermentación en comparación al control según (Cao, et al., 2014). En la **Gráfica de resultados 24**, se presenta el resultado de las diferentes concentraciones de estos compuestos que se generan tras el tratamiento.

Gráfica de resultados 24: Concentraciones de ácido benzoico y fenol en todas las muestras (mg/L).



Analizando la presencia de una alta concentración de ácido benzoico en la muestra SIN TRATAMIENTO, se infiere que el compuesto está posiblemente contenido dentro del material y se descompone, liberándose fácilmente al someterse a un proceso de hidrólisis. Por lo que, tras un tratamiento en el extrusor se incrementa la concentración de este compuesto, ya que el interior de las fibras se muestra más expuesto, lo que provoca mayor liberación de este ácido. En otras palabras, una muestra con mayor acceso al interior del material provoca mayor escape de este producto en la hidrólisis enzimática.

Por el contrario, la concentración del fenol aumenta tras efectuarse un tratamiento más agresivo en el porcentaje de sosa (**Gráfica de resultados 24**). Sin embargo, la concentración del fenol en los filtrados se encuentra disminuida, esto implica que para la formación de

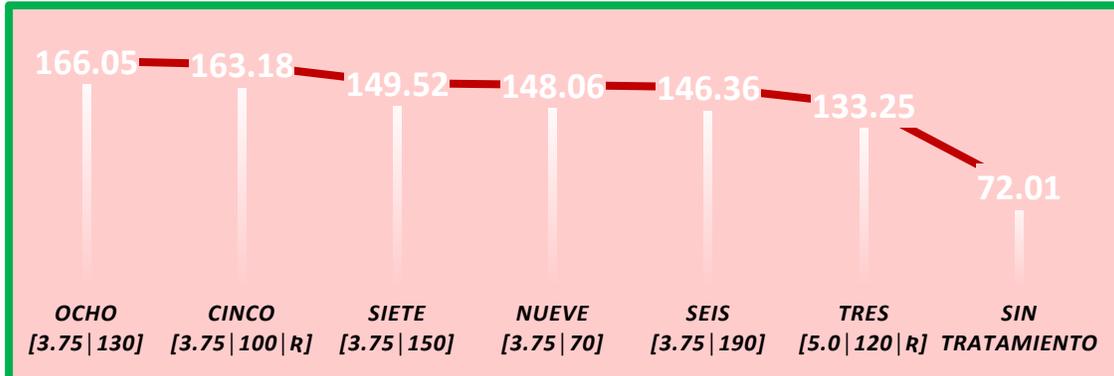
fenol es necesario un ambiente ácido como la hidrólisis enzimática, que posiblemente disocia o descompone mayor número de compuestos de la lignina. El resultado en el aumento de la concentración del fenol por el proceso de hidrólisis sugiere que es necesario métodos que extraigan estos inhibidores, ya que no solo el tratamiento de extrusor libera estos compuestos sino también el proceso de hidrólisis puede incrementar este número y provocar una disminución en rendimiento de azúcares reductores o en la fermentación.

En cuanto al grupo B, la concentración más alta de fenol fue la de la muestra OCHO [3.75% | 120°C] y NUEVE [3.75% | 70°C], posiblemente una menor temperatura genera que el flujo del fluido sea menor y la sosa actúa mayoritariamente en los componentes externos lignocelulósicos que rodean a la celulosa (véase anexo). Sin embargo, la diferencia en la cantidad de fenol no es muy diferente entre ellas ya que como se ha explicado anteriormente las modificaciones en la temperatura afectan más a los componentes de la hemicelulosa y no tanto a los aromáticos de la lignina.

Se finaliza con la evaluación de una sustancia con un grupo cetónico y otras dos sustancias fenólicas que son señaladas con capacidad inhibitoria (Klinke, et al., 2004) y que son el 4-hidroxiacetofenona, el guayacol y el catecol. Estas se presentan en las muestras a una concentración menor a 1.0 mg/L, por lo que esta cantidad resulta poco probable que sea clave para la inhibición en el proceso de la hidrólisis o de la fermentación.

Para concluir, se presenta dos gráficas que señalan la suma de los inhibidores que se encontraron a concentraciones superiores a 5 mg/L. Estos fueron el hidroximetilfurfural, el ácido benzoico, el ácido 3-4 dihidroxibenzoico, el fenol y el ácido cumárico. La **Gráfica de resultados 25** muestra que la cantidad de inhibidores totales del grupo A y B no cumplen con la suposición, en que pretratamientos con condiciones más agresivas promueven la liberación de mayores compuestos inhibidores que afectan a la hidrólisis o la fermentación y por el contrario muestras con mejores rendimientos y condiciones no tan agresivas contienen mayor cantidad de estos inhibidores.

Gráfica de resultados 25: Suma total de los principales inhibidores en el grupo A, B y el control (mg/L).

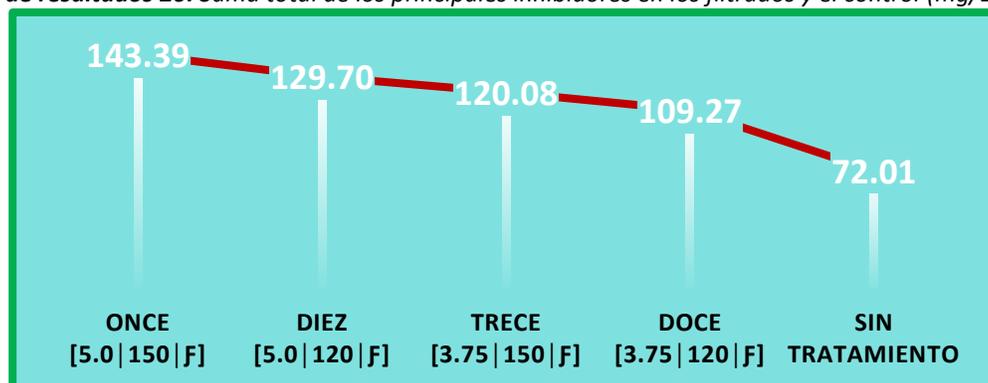


A pesar de que los resultados no fueron los esperados, cabe detallar que su medición se llevó a cabo después de la hidrólisis enzimática, proceso que modifica física y químicamente el extrudado al eliminar el soporte sólido de la celulosa, que además utiliza un ácido débil a una temperatura de 50°C para el funcionamiento de las enzimas. Por lo que este procedimiento pudo haber promovido la inestabilidad estructural, la disociación de componentes de hemicelulosa-lignina o hasta una posible formación de compuestos aromáticos por polisacáridos como lo señala (Jonsson, et al., 1998), que resulta en un incremento en la cantidad de inhibidores en especial los que tienen mayor accesibilidad al material y mayor rendimiento.

Sin embargo, hay que señalar que hace falta investigar la concentración de compuestos de menor peso molecular, ya que existe la posibilidad de que los compuestos evaluados fueran degradados en los tratamientos más agresivos y esta sea la razón por la que disminuye su concentración. No obstante, en el grupo de los filtrados si se presenta la tendencia esperada, que señala que a tratamientos más agresivos mayores concentraciones de inhibidores, por lo que habría que evaluar a los extrudados antes de la hidrólisis y verificar que tanto afecta este proceso a los componentes.

En seguida, se presenta en la **Gráfica de resultados 26** la concentración total de inhibidores de las muestras del grupo C de los filtrados y su control.

Gráfica de resultados 26: Suma total de los principales inhibidores en los filtrados y el control (mg/L).



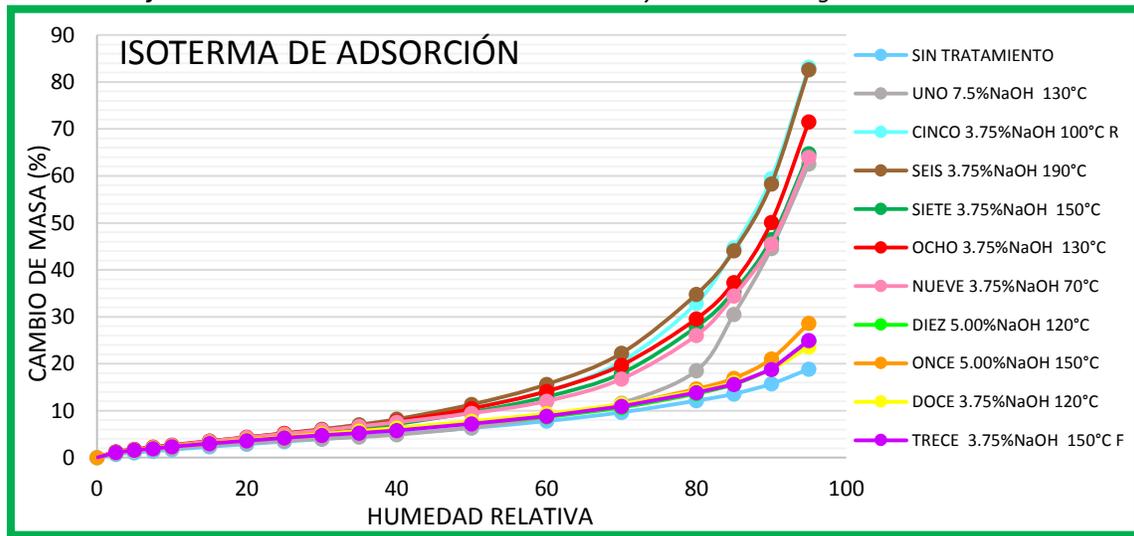
En los filtrados como se mencionó, si se observa la tendencia esperada con un incremento en la concentración de los inhibidores por un aumento en las condiciones del tratamiento. Es decir a mayor temperatura y concentración de sosa mayor cantidad de compuestos relacionados con la inhibición enzimática y la fermentativa. Por lo que se reitera que gracias a la extracción compuestos que son clasificados como inhibidores, mejora el rendimiento en la hidrólisis enzimática y su concentración depende del grado de agresividad del tratamiento en especial si se incrementa el porcentaje de sosa.

Como comentario final, se debe aclarar que estas pruebas en el bagazo de agave extrudado son los primeros experimentos que determinan la concentración de inhibidores y solo se evaluaron trece de los más de cien compuestos que se han relacionado con una capacidad tóxica tanto para la hidrólisis como para la fermentación. Pero, es un primer comienzo para futuras investigaciones y gracias a estos resultados se concluyen que la hidrólisis enzimática también promueve la liberación de inhibidores, el proceso de filtración retira gran parte de estos componentes y dependiendo de la intensidad del pretratamiento es la cantidad de compuestos que se liberan.

7.5. RESULTADOS DE LOS DIAGRAMAS DE ISOTERMAS POR DVS

A continuación, se muestra las isotermas de absorción y desorción obtenidas por la técnica dinámica de sorción de vapor (**Gráfica de resultados 27 y 28**), con la isoterma de adsorción se determina el área de superficie específica y con la isoterma de desorción el promedio de volumen de poro, estas evaluaciones se realizaron en diez muestras y su control (**Tabla 7**).

Gráfica de resultados 27: Isotermas de adsorción y desorción de agua en las muestras.



Gráfica de resultados 28: Isotermas de desorción de agua en las muestras.

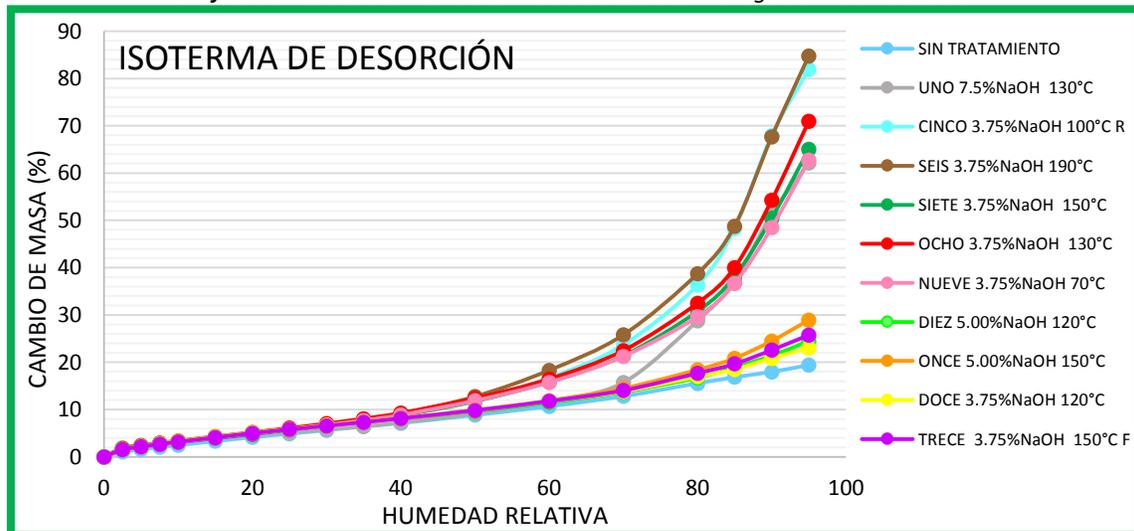


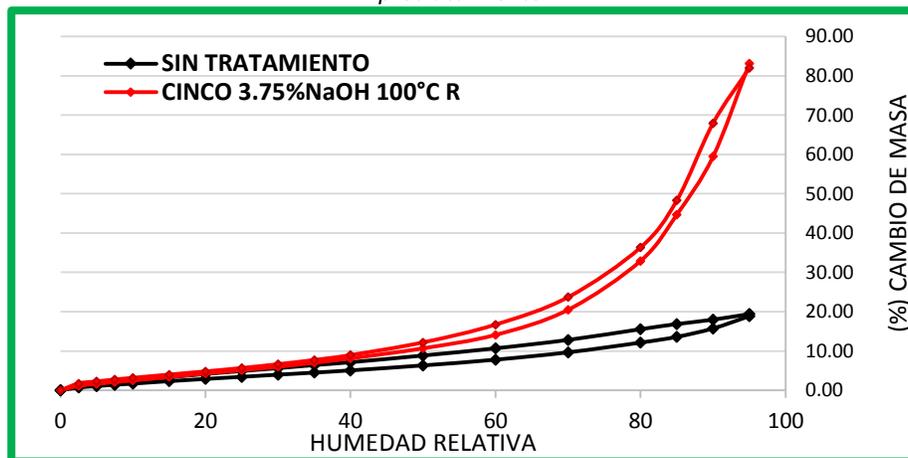
Tabla 7: Área superficial y promedio de volumen de poro de las diferentes muestras.

Muestras	Área Superficial específica (m ² /gr)	Promedio de volumen de poro (mm ³ /gr)
SIN TRATAMIENTO	130.96	44.51
UNO [7.5% 130°C]	117.57	161.50
CINCO [3.75% 100 R]	202.68	221.55
SEIS [3.75% 190°C]	202.12	233.21
SIETE [3.75% 150°C]	165.51	171.62
OCHO [3.75% 130°C]	185.33	185.21
NUEVE [3.75% 70°C]	187.46	162.70
DIEZ [5.0 120 F]	151.27	54.50
ONCE [5.0 150 F]	156.80	66.55
DOCE [3.75 120 F]	155.82	51.10
TRECE [3.75% 150°C F]	142.87	58.65

7.5-1 Análisis de los resultados del contenido de área superficial y porosidad

La IUPAC establece que las isotermas de fisisorción se clasifican en seis tipos según los tamaños de poro y los ciclos de histéresis en cuatro tipos según las estructuras de los poros. De la **Gráfica de resultados 29** se expone el fenómeno de adsorción-desorción de una muestra de bagazo de agave pretratado con su control y se clasifican por su isoterma en un tipo dos y por su ciclo de histéresis en un tipo tres (Lowell, et al., 2004).

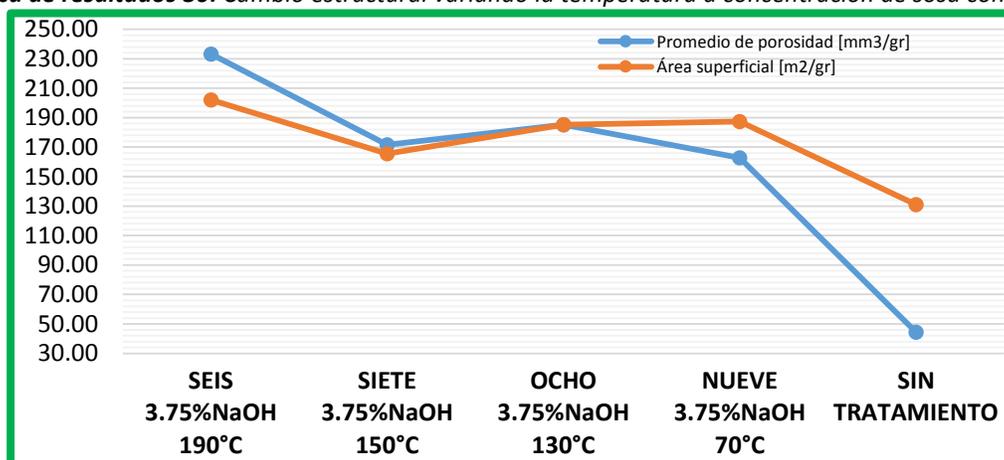
Gráfica de resultados 29: Isotermas de adsorción y desorción del bagazo de agave con pretratamiento y sin pretratamiento.



La isoterma tipo dos se caracterizan por presentar una reducida sorción a presiones relativamente bajas y sin un límite de adsorción a presiones relativas elevadas. También, se asocia a una superficie no porosa o una superficie macroporosa. Además, ambas muestras presentan un tipo de histéresis tres, que se relaciona por dos casos; el primero, es en donde existen capilares muy anchos que tienen aberturas estrechas y el segundo, es donde existen poros con forma de placas paralelas. Este tipo de histéresis es característico de las arcillas.

Analizando los resultados de la **Tabla 7**, se observa claramente una tendencia de incremento en el área superficial específica y volumen de poro al incrementar las condiciones de temperatura y porcentaje de hidróxido de sodio en el tratamiento del extrusor. Esto confirma que el objetivo del tratamiento de penetrar en el interior de la estructura del bagazo y exponer una mayor superficie al ataque de las enzimas es exitoso. En la **Gráfica de resultados 30** se examina las modificaciones estructurales variando únicamente la temperatura a concentración de sosa constante.

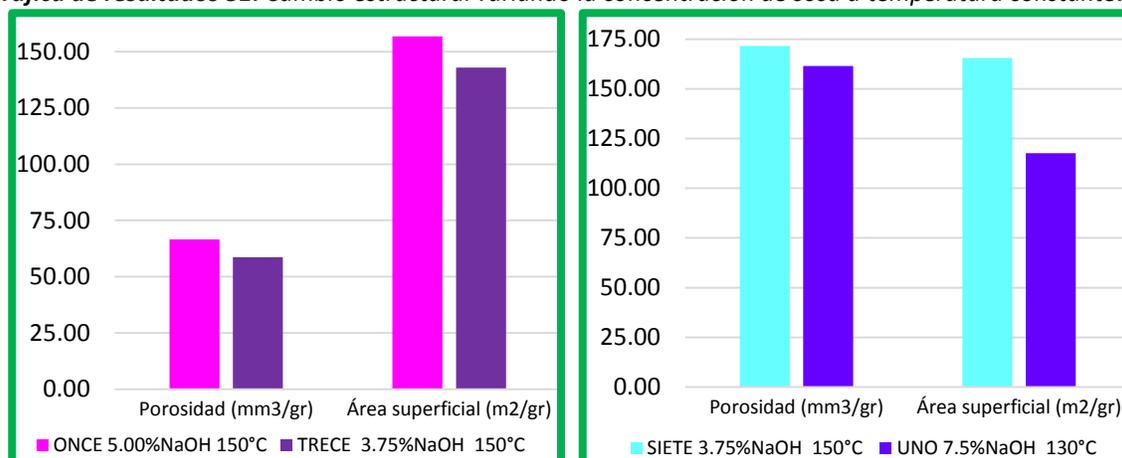
Gráfica de resultados 30: Cambio estructural variando la temperatura a concentración de sosa constante.



Se percibe una mayor modificación en el aumento del volumen de los poros que en el incremento del área superficial, esto puede deberse a que la hemicelulosa es más susceptible a la temperatura y al incrementarse provoca grietas o aberturas que funcionan como poros en el material. Entre las muestras SIETE [3.75% | 150°C] y OCHO [3.75% | 130°C] no se presenta un cambio tan visible, ya que el cambio de temperatura es solo de 20°C. Por

otra parte estos datos son similares a otros estudios que muestran un incremento de área y porosidad tras un tratamiento con incrementos de temperatura (Equihua-Sánchez & Barahona-Pérez, 2017). Continuando con las demás muestras, se presenta la **Gráfica de resultados 31** y ahora se comparan incrementos del porcentaje de sosa a temperatura constante.

Gráfica de resultados 31: Cambio estructural variando la concentración de sosa a temperatura constante.

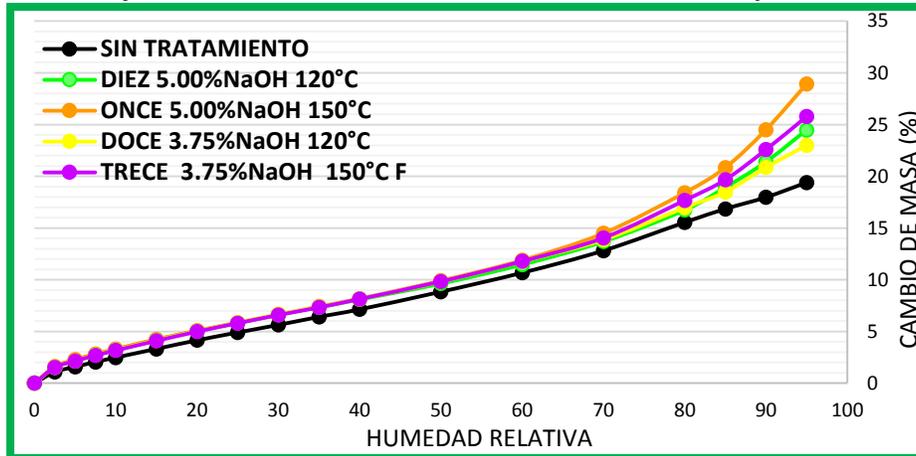


De la gráfica anterior se observa también el incremento del área superficial y del volumen de poro por un incremento en la concentración de sosa. Además, el argumento que señala que un tratamiento muy severo (Equihua-Sánchez & Barahona-Pérez, 2017), como en el caso de la muestra UNO [7.50% | 130°C] con una alta concentración de sosa, genera descomposición en los componentes del bagazo o un colapso de la estructura, que provoca la reducción del área superficial y el volumen del poro.

Enseguida se muestran las isoterms de desorción de las muestras filtradas (**Gráfica de resultados 32**) y se concluye que a condiciones de temperatura y concentración de sosa más altas alcanzan mayor volumen de poro y área superficial. Así mismo, entre las muestras DIEZ [5.00% | 120°C | F] y TRECE [3.75% | 150°C | F], una con mayor porcentaje de sosa y menor temperatura y la otra viceversa, se consiguió en la muestra trece un mayor volumen de poro pero menor área superficial y en la diez una mayor área pero menor volumen. Con

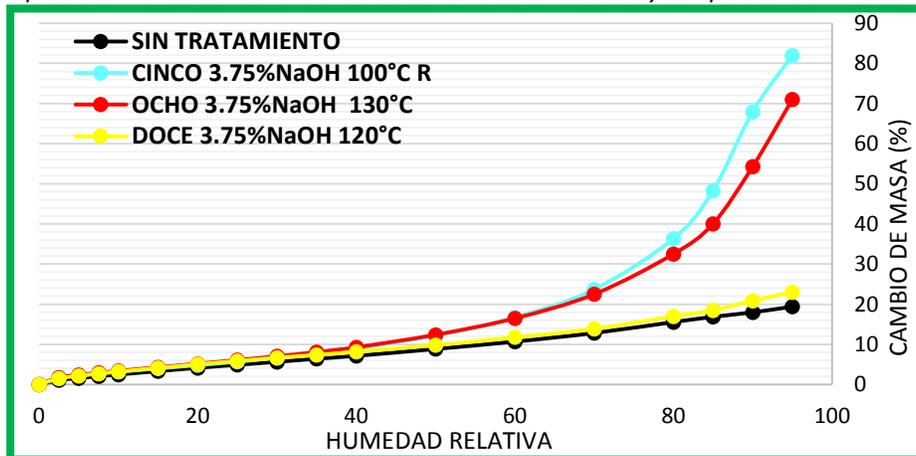
estos resultados podría inferirse que la temperatura está más correlacionada al incremento en la porosidad y la concentración de sosa al incremento del área superficial.

Gráfica de resultados 32: Isotermas de desorción de muestras filtradas.



Más adelante, se expone una gráfica que compara las isotermas de desorción entre los diferentes procedimientos de pretratamiento (**Gráfica de resultados 33**).

Gráfica de resultados 33: Isotermas de desorción de muestras a diferentes procedimientos de pretratamiento con condiciones de concentración de sosa y temperatura similares.



Examinando estas isotermas, el incremento del volumen de porosidad y área superficial se obtiene en la muestra cinco a pesar de tener una temperatura baja y una concentración de

sosa no muy alta, por lo que la efectividad del doble tiempo de residencia es evidente que incrementa el área de contacto.

Con respecto a las muestras OCHO [3.75% | 130°C] y DOCE [3.75% | 120°C | F] con condiciones de tratamiento similares pero la última con filtración, se hace visible la disminución de porosidad y área superficial por el proceso de filtración. La explicación más lógica es que al extraer parte del líquido en el proceso se remueven componentes lignocelulósicos del extrudado, con lo que disminuye cierta cantidad de materia en la muestra. Además muchos de los poros son colapsados a la falta de material y agua interna que soporta la estructura reduciendo considerablemente el área de contacto.

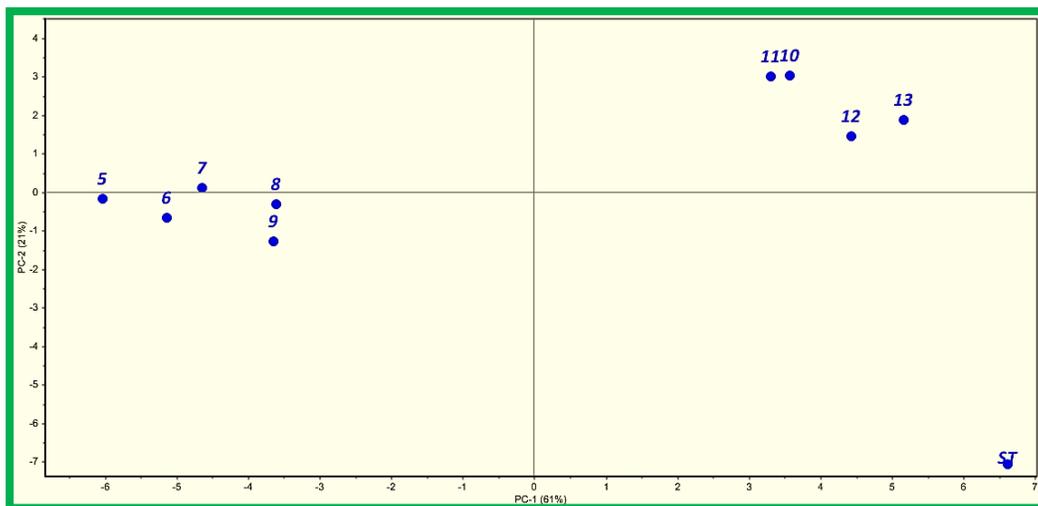
A pesar de la disminución de área y volumen en muestras filtradas, el rendimiento en la hidrólisis mejora, por lo que se deduce que el efecto de la eliminación de componentes no celulósicos es decisivo para la optimización de la hidrólisis. Sin embargo, es indiscutible que cualquier forma de pretratamiento incrementa tanto el área superficial como el volumen de poro, que favorece la eliminación de productos no celulósicos, lo que provoca una mayor accesibilidad a las enzimas y por ende un mejoramiento en el rendimiento hidrolítico y fermentativo.

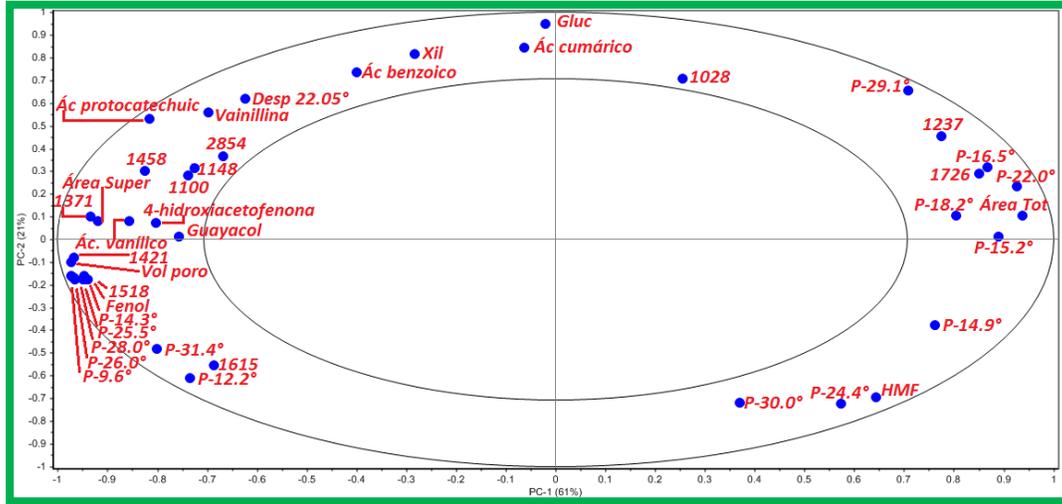
7.6. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES QUE CORRELACIONA TODOS LAS METODOLOGÍAS EMPLEADAS

Se realizó el análisis de componentes principales de todos los resultados obtenidos por las diferentes metodologías empleadas para la caracterización de las muestras pretratadas a diferentes condiciones en el extrusor: potencial de sacarificación, principales difracciones de rayos x, principales señales de infrarrojo, concentración de inhibidores, volumen de poro y área superficial. Este análisis facilitó ver el conjunto de todos los resultados en una sola gráfica y determinar la relación de los resultados con cada una de las muestras, así como también identificar que muestras presentan mayor similitud o mayor diferencia (**Gráfica de resultados 34**).

Existen algunos resultados que se eliminan, ya que muestran una correlación menor al 50% y no proporcionan mucha información para la caracterización e identificación de las diferentes muestras. Por otro lado, las muestras UNO [7.50% | 130°C], DOS [5.00% | 120°C], TRES [5.00% | 120°C | R] y CUATRO [3.75% | 100°C] no fueron incluidas en este análisis debido a que no se contenía con toda la información por falta de material y tiempo para llevar a cabo su estudio.

Gráfica de resultados 34: ACP de todas las variables.





Del ACP, se observa que existe una mayor correlación o similitud de las muestras de cada grupo, así mismo, la lejanía de la muestra SIN TRATAMIENTO demuestra la modificación física y química en el bagazo agave tras tratarse en el extrusor. Las muestras con cambios en el porcentaje de sosa se encuentran más separadas que con cambios en la temperatura en este estudio, ya que posiblemente la variación de temperatura no modificaron tanto al material como la variación del porcentaje de sosa.

La mayor correlación entre las muestras filtradas y los resultados son: el aumento de los picos de difracción $2\theta=15.2^\circ$, 16.5° , 18.2° , 22.0° , 29.1° y el área total del difractograma de RX, el incremento de los picos de infrarrojo 1028, 1237, 1726. En cambio, los resultados con menor afinidad al grupo C son los inhibidores, el área superficial, el volumen de poro, entre otros, ya que los hidrolizados enzimáticos de las demás muestras generan mayor concentración de inhibidores, área superficial y volumen de poro.

Por otro lado el grupo B presenta una mayor correlación con: el aumento de los picos de difracción $2\theta= 9.6^\circ$, 12.2° , 14.3° , 25.5° , 26.0° , 28.0° , 31.4° y desplazamiento del pico principal $2\theta= 22.5^\circ$, el incremento de las señales de infrarrojo 1100, 1148, 1371, 1421, 1458, 1518, 1615, 2854, el incremento en la concentración de ácido vanílico, guayacol, vainillina,

4-hidroxiacetofenona, ácido protocatechuic, ácido benzoico y fenol, aumento en el volumen de poro y el área superficial.

Así mismo, la localización de la muestra SIN TRATAMIENTO, alejada de las demás muestras, presenta una mayor correlación con los picos de difracción de RX $2\theta=14.9^\circ$, 24.4° y 30.0° y aumento de la concentración del HMF. Además entre más negativa se localice la muestra en el componente principal dos significa que el tratamiento tiende a ser más suave y por el contrario entre más grande sea el número del componente principal dos más agresivo fue el tratamiento.

En conclusión este análisis es de gran ayuda, ya que si no se conoce el tratamiento de alguna muestra, con solo efectuar un análisis espectrográfico o de difracción y compararlo con algunos de estos gráficos se podría identificar fácilmente la muestra. Por otro lado facilita la identificación y las principales propiedades que describen a las muestras en las diferentes metodologías de caracterización. Es importante añadir que es necesario incrementar el número de muestras con su análisis y su caracterización para un mejorar este estudio, pero como se ha mencionado con anterioridad son una de las primeras investigaciones de caracterización en este tipo de material y proceso.

8. CONCLUSIONES

En principio, el análisis de difracción de rayos x presenta componentes del material lignocelulósico que interfieren con la refracción de la celulosa por lo que se complica la comprensión de algún cambio morfológico. Además, el índice de cristalinidad según muchos artículos es un método falible, por lo que no se propondría como método clave para la determinación de la estructura de la celulosa. Sin embargo, este análisis confirma que cristales no celulósicos presentes en el bagazo disminuyen gracias a la filtración, la temperatura no provoca cambios significativos en la estructura de la celulosa, pero el doble tiempo de residencia y la concentración de sosa si presentan un mayor impacto en la estructura de la celulosa, que incluye indicios de la transformación a una celulosa tipo dos.

En segundo lugar, el análisis de los espectros de infrarrojo existen también traslapes de las bandas y resulta en un empobrecimiento en la capacidad de discernir las modificaciones de los diferentes grupos funcionales de cada componente lignocelulósico. Sin embargo, es un método simple que ofrece mucha información con respecto a las modificaciones químicas que surgen tras el pretratamiento, ya sea por el aumento o la disminución de grupos específicos, que además aportan una relativa idea de la proporción de cambio. Por lo que este método refleja mayores diferencias entre los diferentes tratamientos, haciéndolo un método más completo, sencillo y con mayor potencial en la caracterización.

En tercer lugar, el análisis por el método de HPLC para identificar inhibidores es un estudio muy particular y preciso, pero al mismo tiempo muy riguroso, ya que existen más de 100 compuestos que fungen como posibles inhibidores y es necesario mucho tiempo para determinar su existencia, su concentración y su impacto inhibitorio tanto en la hidrólisis enzimática como en la fermentación. Sin embargo, este estudio logró identificar algunos compuestos con alto potencial tóxico. También, en el grupo de los filtrados se mostró que al elevar la intensidad de las condiciones de extrusión se incrementa la concentración de estos compuestos. Así mismo, se determinó que gracias al proceso de filtración, en

promedio un 80% de estos productos son extraídos y eliminados del extrudado, logrando con ello incrementar el potencial de sacarificación, pero el proceso de hidrólisis enzimática también puede generar estos subproductos y afectar los procesos subsiguientes.

Por otro lado, el análisis por el método DVS resultó ser un estudio útil para entender la estructura y capacidad de adsorción dentro del material que se consigue después de las diferentes condiciones de tratamiento. Sin embargo, se observa que el incremento de área superficial y porosidad no es un parámetro contundente para pronosticar el rendimiento de azúcares reductores, ya que también existen otros factores que afectan la eficiencia del proceso como sustancias inhibitorias o la morfología de la celulosa.

Así mismo, el análisis de componentes principales es una herramienta muy útil que logra facilitar la identificación de muestras y propiedades que se correlacionan con el incremento del rendimiento hidrolítico y que mediante la inclusión de datos de una simple técnica espectroscópica, este diagrama tiene la capacidad de pronosticar y determinar las características de futuras muestras que contengan similitud a otras muestras ya analizadas.

Para terminar, este estudio comienza a definir, explicar y medir los cambios microscópicos y macroscópicos que sufre el material en el paso a través del extrusor y su relación con la hidrólisis enzimática. Resultó que las condiciones óptimas de tratamiento son un porcentaje de sosa de entre 3.75% a 5.0% con temperaturas de entre 130°C a 150°C y que además si se le añade un proceso de filtración o doble tiempo de residencia favorece el tratamiento. Sin embargo la materia prima (el bagazo de agave) es un material con una composición muy heterogénea, por lo que son necesarias mayores investigaciones que reafirmen y provean de más información para perfeccionar la optimización del proceso de pretratamiento a través del extrusor. Así mismo, se espera que esta tesis sea útil para incentivar el uso de biocombustibles amigables con el medio ambiente, tras el peligro inminente que sufre el planeta por el cambio climático y el aumento de la escasez de recursos energéticos.

9. RECOMENDACIONES

Algunas recomendaciones que ayudaría a complementar la información de este estudio y que faltaría por realizar y analizar son:

- Identificar un mayor número de inhibidores, especialmente de menor peso molecular que probablemente son formados en muestras con tratamiento más intenso.
- Medir la concentración de inhibidores tanto antes como después de la hidrólisis enzimática y analizar las cantidades que surgen después de este proceso.
- Evaluar la toxicidad de los compuestos inhibidores analizados en la hidrólisis enzimática y la fermentación alcohólica y comprobar si estos compuestos son verdaderamente la causa de la inhibición.
- Incrementar el número de muestras que verifiquen los resultados y el análisis que se expusieron en este estudio.
- Verificar el pronóstico del rendimiento enzimático en la hidrólisis utilizando el ACP.
- Incluir otros métodos que puedan incrementar la comprensión de las pruebas de pretratamiento sobre el bagazo como: como el área de superficie disponible específico de celulosa, el grado de polimerización, el tamaño de partícula, parámetros físicos de transporte de masa, espectros de resonancia magnética, cinética enzimática, entre otros.

BIBLIOGRAFIA

1. Ahvenainen, Kontro & Svedstrom, 2016. Comparison of sample crystallinity determination methods by X-ray diffraction for challenging cellulose I materials. *Cellulose*, Volume 23, pp. 1073-1086.
2. BABET-REAL5, 2016. *Welcome to the BABET-REAL5 project website!*. [Online]
Available at: <https://www.babet-real5.eu/>
3. Bawadi, Syed & Zahra, 2019. Fourth generation biofuel: A review on risks and mitigation strategies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 107, p. 37–50.
4. Brandt, Gräsvik, Hallett & Welton, 2013. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chemistry*, Volume 15, pp. 550-583.
5. Camo Analytics, 2014. *An Introduction to Multivariate Data Analysis with The Unscrambler X*. [Online]
Available at: <https://www.youtube.com/watch?v=Un8-K0grdu8>.
6. Cao, et al., 2014. Inhibitory Activity of Carbonyl Compounds on Alcoholic Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 62, p. 918–926.
7. Casa Sauza , 2017. *Impacto de los residuos de la industria tequilera*. [Online]
Available at: <http://www.casasauza.com/procesos-tequila-sauza/impacto-residuos-industria-tequilera>
8. Chandra, et al., 2007. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of Lignocellulosics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Volume 108, p. 67–93.
9. Cheng, Huang, Wang & Zhang, 2016. Effect of Different Heat Treatment Temperatures on the Chemical Composition and Structure of Chinese Fir Wood. *BioResources*, Volume 11, pp. 4006-4016.
10. Cheng, et al., 2011. Transition of Cellulose Crystalline Structure and Surface Morphology of Biomass as a Function of Ionic Liquid Pretreatment and Its Relation to Enzymatic Hydrolysis. *Biomacromolecules*, Volume 317, pp. 1-11.
11. Ciencia y desarrollo , 2014. *Industria del tequila y generación de residuos*. [Online]
Available at: <http://cienciaydesarrollo.mx/?p=articulo&id=287>
12. Davis, Dohleman & Long, 2011. The global potential for Agave as a biofuel feedstock. *GCB Bioenergy*, Volume 3, p. 68–78.
13. Equihua-Sánchez & Barahona-Pérez, 2017. Physical and Chemical Characterization of Agave tequilana Bagasse Pretreated with the Ionic Liquid 1-Ethyl-3-Methylimidazolium Acetate. *Waste and Biomass Valorization*, Volume 10, p. 1285–1294.
14. ExpokNews, 2013. *¿Cuánto contamina el transporte en México?*. [Online]
Available at: <https://www.expoknews.com/cuanto-contamina-el-transporte-en-mexico/>
15. Ferrer, Alciaturi, Faneite & Ríos, 2016. *Analyses of Biomass Fibers by XRD, FT-IR, and NIR*. Switzerland.
16. Fondo Monetario Internacional et al., 2015. *Posición de México en el mundo*. [Online]
Available at: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/43882/MEX_Ficha_resumen.pdf
17. Garrido, 2012. *Centrales termoeléctricas de biomasa*. Madrid: Renovetec.

18. Garvey, Parker & Simon, 2005. On the Interpretation of X-Ray Diffraction Powder Patterns in Terms of the Nanostructure of Cellulose I Fibres. *Macromolecular Chemistry and Physics*, Volume 206, p. 1568–1575.
19. González, M. M., 2011. *Tesis: Pretratamiento de residuos linocelulósicos de bagazo de agave para su enriquecimiento en celulosa y su valoración de azúcares reductores*, Ciudad de México: s.n.
20. Haque, et al., 2013. Effect of dilute alkali pretreatment on structural features and enhanced enzymatic hydrolysis of *Miscanthus sinensis* at boiling temperature with low residence time. *Biosystems engineering*, Volume 114, pp. 294-305.
21. Health Effects Institute, 2017. *State of Global Air. Special Report*, Boston: MA:Health Effects Institute.
22. He, et al., 2009. Investigation on the Changes of Main Compositions and Extractives of Rice Straw Pretreated with Sodium Hydroxide for Biogas Production. *Energy & Fuels*, Volume 23, p. 2220–2224.
23. Hernández-Meléndez, et al., 2016. Characterization of Blue Agave Bagasse (BAB) as raw material for bioethanol production processes by gravimetric, thermal, chromatographic, X-ray diffraction, microscopy, and laser light scattering techniques. *Bioenergy Research*, Volume 9, pp. 1-13.
24. Huerta, 2011. *Tesis: Pretratamiento de residuos lignocelulósicos en extrusores de doble husillo corrotantes*, Ciudad de México: s.n.
25. International Energy Agency, 2017. *Renewables Information 2017*, France: International Energy Agency. International Energy Agency, 2017. *World Energy Outlook 2017*. [Online] Available at: <https://www.iea.org/weo2017/>
26. Jönsson & Martín, 2016. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, Volume 199, p. 103–112.
27. Jonsson, Palmqvist, Nilvebrant & Hahn-Hagerdal, 1998. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus. *Microbiol Biotechnol*, Volume 49, pp. 691-697.
28. Kafle, Greeson, Lee & Kim, 2014. Cellulose polymorphs and physical properties of cotton fabrics processed with commercial textile mills for mercerization and liquid ammonia treatments. *Textile Research Journal*, Volume 84, p. 1692–1699.
29. Kafle, et al., 2015. Progressive structural changes of Avicel, bleached softwood, and bacterial cellulose during enzymatic hydrolysis. *Nature*, Volume 5, pp. 1-10.
30. Kahar, 2013. *Synergistic Effects of Pretreatment Process on Enzymatic Digestion of Rice Straw for Efficient Ethanol Fermentation*. Marian Petre ed. s.l.:IntechOpen.
31. Klinke, Thomsen & Ahring, 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl Microbiol Biotechnol*, Volume 66, p. 10–26.
32. Liu, et al., 2018. Na₂SO₄ Salt Weathering of Calcium Sulfoaluminate Cement Paste Partially Immersed in a Na₂CO₃ Solution. *Materials in Civil Engineering*, Volume 30, pp. 1-5.
33. Liu & Hu, 2008. X-ray Diffraction Study of Bamboo Fibers Treated with NaOH. *Fibers and Polymers*, Volume 9, pp. 735-739.

34. Loria, 2018. *The amount of carbon dioxide in the atmosphere just hit its highest level in 800,000 years, and scientists predict deadly consequences*. [Online]
Available at: <https://www.businessinsider.com/carbon-dioxide-record-human-health-effects-2018-5>
35. Lowell, Shields, Thomas & Thommes, 2004. *Characterization of porous solids and powders: Surface area, pore size and density*. primera ed. New York: Springer Science+Business Media.
36. Maciel, 2009. Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Economía Informa*, pp. 63-89.
37. Mamo, Faryara & Nordberg, 2013. Microbial glycoside hydrolases for biomass utilization in biofuels applications. *Biofuel Technologies*, p. 171-188.
38. Mitchell, Taylor & Bauer, 2014. Comprehensive Analysis of Monomeric Phenolics in Dilute Acid Plant Hydrolysates. *BioEnergy Research*, Volume 7, p. 654–669.
39. Montiel, 2016. Enhanced bioethanol production from blue agave bagasse in a combined extrusion–saccharification process. *Springer Science + BUSINESS MEDIA*, Volume 9, pp. 1005-1014.
40. Nam, French, Condon & Concha, 2016. Segal crystallinity index revisited by the simulation of X-ray diffraction patterns of cotton cellulose I and cellulose II. *Carbohydrate Polymers*, Volume 135, pp. 1-9.
41. Obi, Shukla, Uma & Varada, 2012. Mechanical and physical characterization of sodium hydroxide treated Borassus fruit fibers. *Journal of Forestry Research*, Volume 24, p. 667–674.
42. Oudiani, Msahli & Sakli, 2017. In depth study of Agave fiber structure using Fourier transform infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, Volume 164, pp. 242-248.
43. Pan, 2008. Role of Functional Groups in Lignin Inhibition of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose to Glucose. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, Volume 2, pp. 25-32.
44. PEMEX, 2017. <http://www.pemex.com/ri/Publicaciones/Paginas/IndicadoresPetroleros.aspx>. [Online].
45. Portal académico CCH, 2017. *Polisacáridos*. [Online] Available at:
<https://portalacademico.cch.unam.mx/alumno/quimica2/unidad2/carbohidratos/polisacaridos>
46. Rahikainen, et al., 2011. Inhibition of Enzymatic Hydrolysis by Residual Lignins From Softwood—Study of Enzyme Binding and Inactivation on Lignin-Rich Surface. *Biotechnology and Bioengineering*, Volume 108, pp. 2823-2834.
47. Saratale & Oh, 2015. Improving alkaline pretreatment method for preparation of whole rice waste biomass feedstock and bioethanol production. *RSC Advances*, Volume 5, pp. 97171-97179.
48. SEMARNART, 2015. *Informe de la situación del medio ambiente en México 2015*, México: s.n.
49. SENER, 2017. *Balance nacional de energía 2016*, México: s.n.
50. Simão, et al., 2016. Effect of Fiber Treatment Condition and Coupling Agent on the Mechanical and Thermal Properties in Highly Filled Composites of Sugarcane Bagasse Fiber/PP. *Materials Research*, Volume 19, pp. 746-751.

51. Sivasangar, Taufiq-Yap, Zainal & Kitagawa, 2013. Thermal behavior of lignocellulosic materials under aerobic/anaerobic environments. *International journal of hydrogen energy*, Volume 38, pp. 16011-16019.
52. Statwiki, 2014. *PCA in Neuroscience*. [Accessed 2018] [Online] Available at: https://wiki.math.uwaterloo.ca/statwiki/index.php?title=File:PCA_in_Neuroscience.png&oldid=23210.
53. Sunkyu, et al., 2010. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*, Volume 2, pp. 1-10.
54. Surface Measurement Systems Ltd, 2003. *DVS Standar Analysis Suite v4.4-User Manual*, UK: SMS.
55. Technopow, 2018. *Bioethanol Market Study, Synthesis and Summation 2018 to 2025*. [Online] Available at: <https://technopow.com/2018/01/09/bioethanol-market-2/>
56. Teli & Jadhav, 2017. Effect of Mercerization on the Properties of Pandanus Odorifer Lignocellulosic Fibre. *Journal of Polymer and Textile Engineering*, Volume 4, pp. 07-15.
57. Tovar-Herrera, 2013. *Tesis: Evaluación de un material lignocelulósico para la producción de celulasas, xilanasas y lacasas por basidiomicetos del noroeste de México*, Nuevo León: s.n.
58. United States Environmental Protection Agency, 2017. *Global Greenhouse Gas Emissions Data*. [Online] Available at: <https://www.epa.gov/ghgemissions/global-greenhouse-gas-emissions-data>
59. Vandenbossche, et al., 2014. A new lignocellulosic biomass deconstruction process combining thermo-mechano chemical action and bio-catalytic enzymatic hydrolysis in a twin-screw extruder. *Industrial Crops and Products*, Volume 55, p. 258–266.
60. Vertès, Qureshi, Blaschek & Yukawa, 2010. *Biomass to Biofuels: Strategies for Global*. United Kingdom: John Wiley & Sons.
61. Wyman, Decker & Himmel, 2005. Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose. *Polysaccharides Structural Diversity and Functional Versatility*, p. 995–1033.
62. Ximenes, et al., 2010. Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 46, p. 170–176.
63. Yue, et al., 2015. Characterization of cellulose I/II hybrid fibers isolated from energycane bagasse during the delignification process: Morphology, crystallinity and percentage estimation. *Carbohydrate Polymers*, Volume 133.
64. Yusuf, 2017. Agro-Industrial Waste Materials and their Recycled Value-Added Applications: Review. *Handbook of Ecomaterials*, Agosto.pp. 1-11.
65. Zhang, et al., 2019. Investigation of alkaline hydrogen peroxide pretreatment and Tween 80 to enhance enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biotechnology for Biofuels*, Volume 12, pp. 107-115.
66. Zulkiple, Yusuf Maskat & Hassan, 2016. Pretreatment of Oil Palm Empty Fruit Fiber (OPEFB) with Aqueous Ammonia for High Production of Sugar. *Procedia Chemistry*, Volume 18, pp. 155-161.

ANEXO

GENERALIDADES DEL POTENCIAL DE SACARIFICACIÓN

La eficiencia del pretratamiento es evaluada a través de la liberación de azúcares después de la hidrólisis y el uso de enzimas tiene importantes ventajas, como las condiciones suaves del proceso (pH entre 4.0 y 7.0 con temperaturas de entre 40°C y 60°C), altos rendimientos, especificidad y el hecho de que las reacciones con las enzimas no producen productos derivados que pueden afectar negativamente a la fermentación (Montiel, 2016).

De la evaluación de diferentes cocteles enzimáticos comerciales se encontró que el coctel *Cellic CTec2* (Novozyme) mostraba los mejores resultados en el rendimiento hidrolítico del bagazo de agave, la cual contiene una actividad celulolítica de 93 FPU/ml y una actividad de las xilanasas de 10 062 UI/ml (Montiel, 2016).

Es ampliamente reconocido que la efectividad en la velocidad y el alcance de la hidrólisis se ven influidas no solo por la eficacia de las enzimas, sino también por las características morfológicas y químicas del sustrato lignocelulósico. Entre los factores que influyen en la degradación y rendimiento enzimático incluyen los esfuerzos cortantes durante la mezcla, inhibición del producto por la celobiosa y glucosa, presencia de materiales extraños que impiden la acción de las celulasas, cristalinidad de la celulosa, grado de polimerización y cantidad de área de superficie disponible para reaccionar con celulasas (Chandra, et al., 2007).

Se muestra en la **Figura 30** un modelo conceptual propuesto del mecanismo de sacarificación enzimática mejorada dentro de las fibras del material lignocelulósico, mediante un proceso de pretratamiento por extrusor, que involucran la ruptura de enlaces de lignina e hinchazón por el tratamiento alcalino y mecánico asociado a la filtración que da como resultado un incremento en el rendimiento de la hidrólisis enzimática (Kahar, 2013).

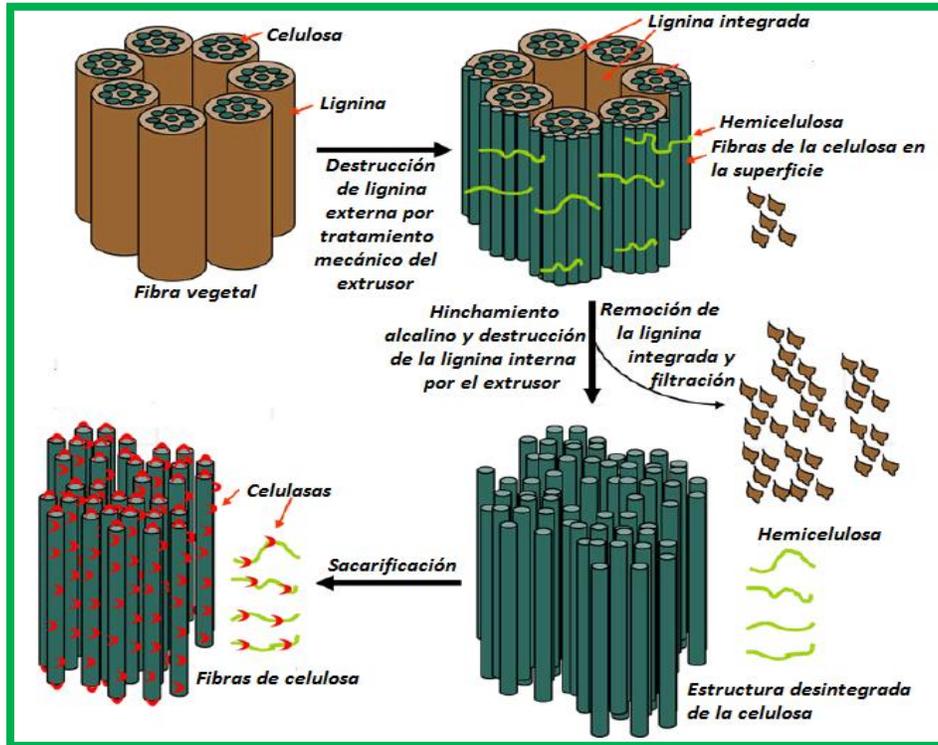


Figura 30: Mecanismo propuesto del incremento de la sacarificación enzimática por el pretratamiento. (Kahar, 2013)

GENERALIDADES DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X

La difracción de rayos X constituye una técnica no destructiva básica, en la cual el material es impactado por un haz de rayos X originando un patrón de difracción y se utiliza para la caracterización de materiales cristalinos, que permite establecer la forma alotrópica en la que está presente la sustancia (Nam, et al., 2016).

Con el análisis de difracción de los rayos X, la celulosa se ha identificado ser un cristal polimórfico con cuatro diferentes estructuras que se modifica tras algún tratamiento. La celulosa I o nativa, es la forma que se encuentra en mayor cantidad en la naturaleza y se identifica por tener un pico de intensidad fuerte en $2\theta=22.6^\circ$, dos picos de intensidad media en $2\theta=14.8^\circ$, $2\theta=16.5^\circ$ y uno pico de intensidad débil en $2\theta=34.4^\circ$. La celulosa II se forma cotidianamente a través de un proceso de mercerización, que consta de un tratamiento con alguna base como NaOH que provoca primero el hinchamiento de las fibras, después la

ruptura de las áreas cristalinas y finaliza con la formación de una nueva red cristalina. Se identifica con un doblete de picos de intensidad fuerte en $2\theta=20.1^\circ$, $2\theta=22.0^\circ$ y un pico de intensidad media en $2\theta=12.2^\circ$ (**Figura 31**). La celulosa III y IV se producen por un tratamiento de amoniaco líquido y en este estudio no se identificaron (Kafle, et al., 2014).

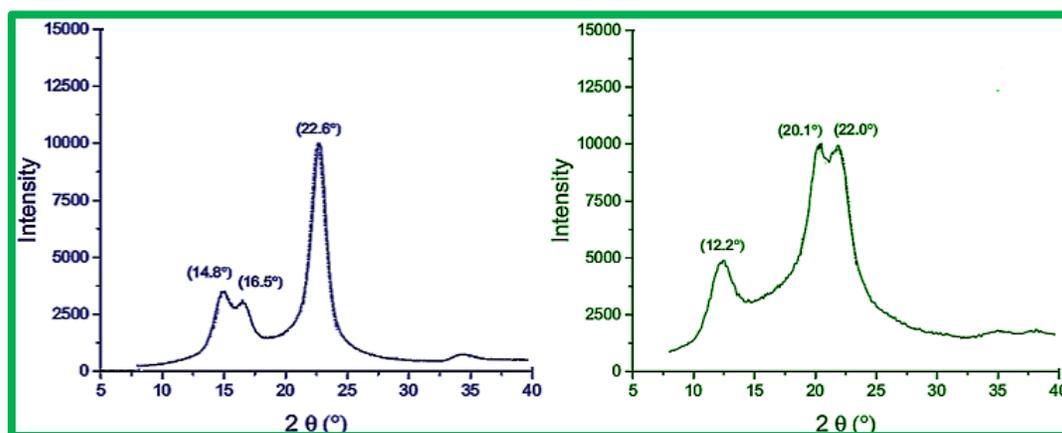


Figura 31: Picos característicos de difracción de rayos X de la celulosa tipo I (izquierda) y tipo II (derecha). (Nam, et al., 2016)

Por otro lado la molienda en la celulosa cristalina puede transformar su estructura en un arreglo amorfo que se caracteriza por un pico ancho alrededor de $2\theta=21.5^\circ$ y una organización de la celulosa desordenada (**Figura 32**) (Sunkyu, et al., 2010).

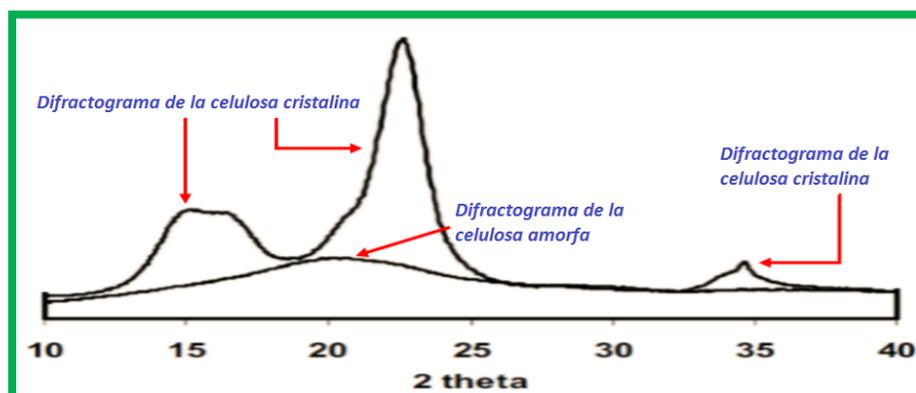


Figura 32: Espectro de difracción de rayos X de la celulosa amorfa y cristalina. (Sunkyu, et al., 2010)

La **Figura 33** muestra los patrones de DRX de los principales componentes lignocelulósicos y debido a que tanto la hemicelulosa como la lignina contienen ramificaciones

heterogéneas de polisacáridos, estas son identificadas en los patrones de DRX por su estructura amorfa con una reflexión amplia en $2\theta=18.9^\circ$ (Sivasangar, et al., 2013).

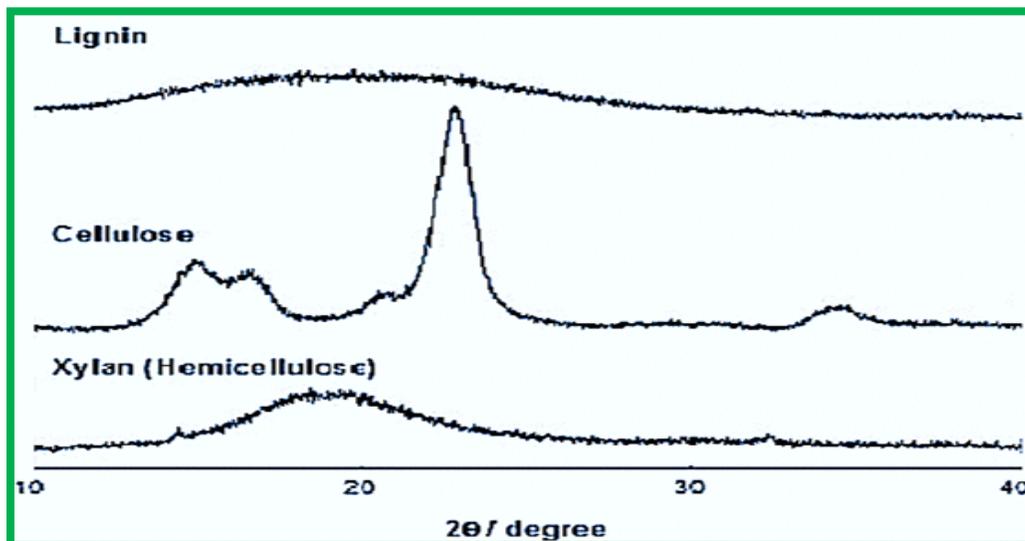


Figura 33: Patrón de difracciones de rayos x de la celulosa, hemicelulosa y lignina.

(Sivasangar, et al., 2013)

Existen varias formas de comparar el grado o índice de cristalinidad después de experimentar un tratamiento, pero el más utilizado es el método de Segal que emplea la relación entre la altura del pico principal con el pico amorfo y se utiliza para determinar la cantidad de material cristalino y amorfo presente en una muestra de celulosa. Se calcula a partir de la siguiente fórmula, donde (I_{200}) es la altura del pico en $2\theta \sim 22.6^\circ$ y la (I_{AM}) es la altura mínima en $2\theta \sim 18^\circ$ (Sunkyu, et al., 2010).

$$Cr.I.' = 1 - \frac{I_{am}}{I_{002}}$$

En el método Segal existen valores de cristalinidad con un índice desde 34% como en el caso del enebro hasta un índice del 100% que se alcanza en la celulosa microcristalina totalmente pura y varía dependiendo del material que se esté estudiando (Ahvenainen, et al., 2016). Sin embargo, este método únicamente es útil para comparar las diferencias relativas entre

muestras del mismo material y se sugiere que solo use como método estimativo por las siguientes razones:

1. La posición propuesta como amorfa que se encuentra aproximadamente en 18° no está alineada con la altura máxima del pico amorfo que tiende a ser superior, por lo tanto, el valor de I_{AM} para el método de altura se subestima significativamente, lo que resulta en una sobreestimación del IC.
2. La celulosa es en realidad más compleja que un modelo de dos fases cristalino y amorfo ya que existen estructuras de transición que no son tomadas en cuenta y también regiones amorfas que están inmersas en el interior de un material cristalino o viceversa.
3. No se considera las superposiciones amorfas de la hemicelulosa y la lignina.
4. Hay al menos cuatro picos cristalinos, pero solo se utiliza el pico más alto (002) en el cálculo. Esto excluye las contribuciones de los otros picos cristalinos, poniendo demasiado énfasis en la contribución de solo una alineación de la red de celulosa.
5. Los picos en el espectro de difracción de celulosa son muy amplios y varían considerablemente en su anchura. No se puede esperar que una simple comparación de la alturas proporcione una estimación razonable de la cristalinidad de la celulosa, ya que se descuida la variación en el ancho del pico, que también puede verse afectada por el tamaño del cristal (Sunkyu, et al., 2010).

Este método empírico no fue diseñado para comparar diferentes tipos de materiales, sino para cuantificar los cambios dentro de un único conjunto de muestras y solo puede tomarse como una aproximación de la contribución de la celulosa amorfa a la difracción cristalina de la celulosa. Sin embargo, se ha observado que la digestibilidad enzimática de diferentes alomorfos cristalinos por la enzima Cel7A tiene el siguiente orden de preferencia: amorfo > III > IV > II > I. Sin embargo existe evidencia de que el tamaño del cristal de la celulosa, podría no ser un factor dominante que causa la disminución de la tasa de hidrólisis y que la DRX puede no ser lo suficientemente sensible como para medir cambios sutiles en el tamaño del cristal (Kafle, et al., 2015).

GENERALIDADES DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER

La espectroscopia FTIR es un método poderoso y rápido, que requiere una cantidad reducida de material para analizar su composición. Esta técnica es no destructiva, en donde el material es impactado por un haz de radiación infrarroja, que provoca cambios vibraciones en la molécula. Las vibraciones moleculares y su intensidad de absorbancia se representan en un espectro por medio de picos de diferente longitud de onda que simbolizan los distintos grupos funcionales de las moléculas de la sustancia. La absorbancia está relacionada con la concentración de la sustancia en una muestra a través de una ecuación llamada Ley de Beer:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

En donde A=absorbancia, ε =constancia de absorptividad l=longitud de la trayectoria y c=concentración. La altura o el área de un pico en un espectro de absorbancia son proporcionales a la concentración, por lo que la Ley de Beer puede usarse para determinar las concentraciones de moléculas en las muestras. Se muestra a continuación (**Figura 34**) la comparación del espectro característico de la madera de abeto y de los diferentes componentes lignocelulósicos: la celulosa, la lignina y la holocelulosa.

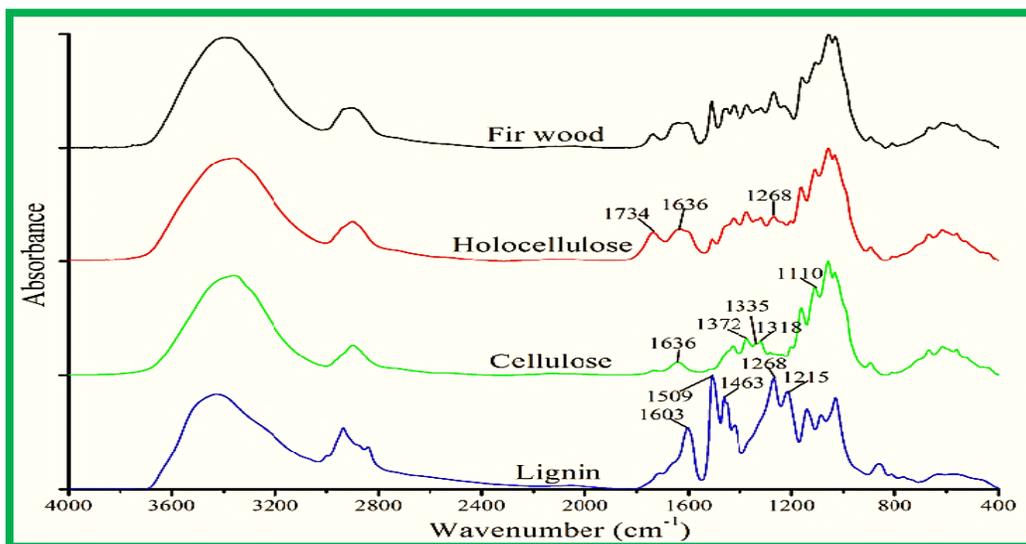


Figura 34: Espectros FTIR de la madera de abeto y sus componentes lignocelulósicos. (Cheng, et al., 2016)

GENERALIDADES DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés), es una técnica que sirve para separar diferentes sustancias que componen una mezcla. Esta separación se realiza gracias a las interacciones químicas que existe entre la columna y la muestra estudiada.

La muestra atraviesa la fase estacionaria, la cual consta de pequeñas partículas esféricas con especiales características químicas las cuales están embebidas dentro de la columna, mientras que fluyen la muestra dentro de la fase móvil por medio de una diferencia de presión. El grado de retención depende de la naturaleza de la sustancia y son detectadas estas mediante algún detector como infrarrojo, ultravioleta o dispersión de luz, que a través de su intensidad se conoce la concentración de la sustancia por medio de una curva patrón.

GENERALIDADES DE LA SORCIÓN DINÁMICA DE VAPOR

La técnica de sorción dinámica de vapor (DVS por sus siglas en inglés) mide la captación y la pérdida de vapor gravimétricamente, esto se realiza mediante el flujo de una concentración conocida de vapor que atraviesa la muestra suspendida en la ultra-micro balanza, el cual mide el cambio en el peso causado por la sorción o desorción de las moléculas de vapor. Con el perfil completo de sorción-desorción, se genera una isoterma y con la ayuda de diferentes modelos se puede calcular el área superficial y la porosidad de la muestra (Surface Measurement Systems Ltd, 2003).

El mecanismo de funcionamiento del equipo DVS es a través de un flujo de vapor, que se produce mediante la mezcla de corrientes secas y saturadas a una humedad específica relativa y que se especifica cuando el nitrógeno seco que es el gas portador pasa a través del solvente. El control del sistema del flujo y de la temperatura, se realiza mediante un sensor de vapor óptico y de temperatura situados cerca de la muestra.

GENERALIDADES DEL ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES

Esta técnica exploratoria de análisis de datos muy utilizada, permite la reducción dimensional manteniendo la mayor información posible (Camo Analytics, 2014). Se utiliza para procesar una enorme cantidad de datos y encontrarle sentido a la información, además localiza e identifica relaciones entre las variables posibilitando el agrupamiento de muestras o datos parecidos (**Figura 35**).

Se realiza mediante un método matemático, que utiliza valores propios y promedios de una matriz de información para la proyección de las variables dentro de un nuevo sistema de coordenadas en una gráfica de dos dimensiones. El eje de componentes principales uno (PC1), es el eje que explica la principal mayor varianza de los datos y el componente principal dos (PC2), es el eje que explica la segunda mayor varianza también de estos datos

Entre sus grandes beneficios se encuentran:

- Reduce la dimensionalidad de los datos e incrementa así la comprensión.
- Extrae la información y remueve ruidos.
- Reduce variables, las identifica y las clasifica.
- Reconoce el surgimiento de una nueva especie.
- Monitorea el proceso y define el estado químico que se esté desarrollando.
- Muestra un análisis visual de la varianza

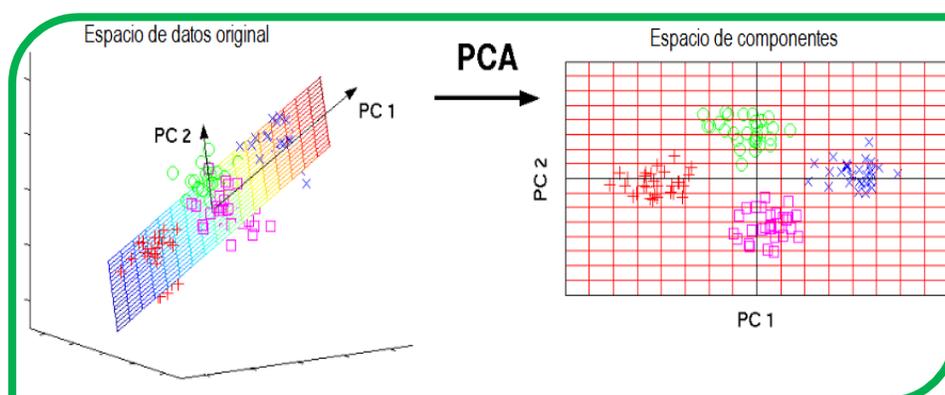


Figura 35: Análisis de componentes principales (PCA).
(Statwiki, 2014)