

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

**Evaluación de diferentes pretratamientos químicos a la
biomasa de la cáscara de cacao para procesos de fermentación
alcohólica**

Proyecto de investigación

José Carlos Benalcazar Bassante

Ingeniería Química

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de Ingeniero Químico

Quito, 18 de mayo de 2018

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS E INGENIERÍAS

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Evaluación de diferentes pretratamientos químicos a la biomasa de la cáscara de cacao para procesos de fermentación alcohólica

José Carlos Benalcázar Bassante

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

José Álvarez, Ph.D.

Firma del profesor

Nombre del profesor, Título académico

Daniela Almeida, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 18 de mayo de 2018

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: José Carlos Benalcázar Bassante

Código: 00118638

Cédula de Identidad: 1722810445

Lugar y fecha: Quito, 18 de mayo de 2018

Agradecimientos

Quiero agradecer a Dios por darme las fuerzas necesarias para continuar y seguir adelante en esta etapa de mi vida.

Quiero agradecer a mis padres Katy y Carlos por su amor, comprensión y apoyo durante estos años, en especial durante la realización de este proyecto. Quiero agradecerles ya que fueron el motor que me motivó a concluir esta etapa, a nunca rendirme y ayudarme a cumplir con mis objetivos y metas cada vez más grandes y difíciles de alcanzar.

A mi hermana Cynthia y mis abuelitos, que siempre estuvieron ahí brindándome su apoyo y amor incondicional.

Quiero agradecer a mi Director de Tesis, ing. José Álvarez, por todas sus enseñanzas y consejos, por estar ahí para guiarme en todas mis dudas y dificultades, por siempre estar presente para brindarme su apoyo y motivarme cada día a lo largo de este proyecto.

Quiero agradecer a mi Co-Directora, ing. Daniela Almeida, por sus consejos, correcciones y guías en este proyecto.

Al departamento de Ingeniería Química y a cada uno de los profesores que lo conforman, por todas las enseñanzas y consejos durante estos años de carrera.

A mis amigos de la infancia y a lo largo de la carrera, por todo su apoyo y motivación diaria para la culminación de este trabajo.

RESUMEN

La presente investigación se enfocó en buscar una alternativa amigable para el medio ambiente para el aprovechamiento de la mazorca de la cáscara de cacao, el cual es un residuo generado en la producción cacaotera, que puede ser usado en la producción de bioetanol. Para ello se evaluó diferentes pretratamientos a la biomasa previamente caracterizada, que consistieron en ataques con ácido sulfúrico, hidróxido de sodio, hidróxido de amonio y agua a diferentes tiempos de reflujo. Luego de cada pretratamiento se caracterizó la lignina y celulosa. Luego de esto, se realizó una hidrólisis enzimática a la biomasa pretratada para una posterior fermentación de los azúcares producidos en esta etapa. Se cuantificó la cantidad de alcohol presente mediante un análisis de cromatografía de gases con espectrometría de masa (GC-MS).

Al caracterizar la cantidad de lignina y celulosa después de los pretratamientos, se obtuvo que el mejor tiempo de reflujo fue de 4h y siendo el pretratamiento con hidróxido de sodio el que produjo la mayor cantidad de celulosa y la menor de lignina, los cuales fueron 55,19% y 24,43%. También se encontró que la mayor cantidad de azúcares reductores generados se dio con este pretratamiento, lo que se tradujo en el mayor rendimiento en la producción de etanol luego de la hidrólisis enzimática. Microscopía electrónica de barrido reveló cambios morfológicos significativos luego de todos los pretratamientos.

Se puede concluir que la biomasa residuo de la mazorca de cacao puede ser aprovechada para la producción de etanol, mediante procesos de pretratamiento con hidróxido de sodio e hidrólisis enzimática para favorecer así la fermentación para la producción de bioetanol.

Palabras clave: mazorca de cacao, biomasa lignocelulósica, pretratamiento, fermentación, bioetanol.

Abstract

The present investigation focused on finding a friendly alternative to the environment for the use of the husk of the cocoa pod, which is a waste generated in cocoa production, which can be used in the production of bioethanol. To this end, different pretreatments to the previously characterized biomass were evaluated, which consisted of attacks with sulfuric acid, sodium hydroxide, ammonium hydroxide and water at different reflux times. After each pretreatment, lignin and cellulose were characterized. After this, an enzymatic hydrolysis was carried out to the biomass pretreated for a later fermentation of the sugars produced in this stage. The amount of alcohol present was quantified by gas chromatography analysis with mass spectrometry (GC-MS).

When characterizing the amount of lignin and cellulose after the pretreatments, it was obtained that the best reflux time was 4h and being the pretreatment with sodium hydroxide the one that produced the highest amount of cellulose and the least of lignin, which were 55,19% and 24,43%. It was also found that the greatest amount of reducing sugars was generated with this pretreatment, which translated into the highest yield in the production of ethanol after the enzymatic hydrolysis. Scanning electron microscopy revealed significant morphological changes after all pretreatments.

It can be concluded that the biomass residue of the cocoa pod can be exploited to produce ethanol, by means of pre-treatment processes with sodium hydroxide and enzymatic hydrolysis to favor fermentation for the production of bioethanol.

Key words: husk, cocoa pod, lignocellulosic biomass, pretreatment, fermentation, bioethanol.

Tabla de contenidos

1. Introducción	11
1.1. Antecedentes	11
1.2. Justificación del proyecto	13
1.3. Objetivos	15
1.3.1. Objetivos generales.....	15
1.3.2. Objetivos específicos.....	15
2. Fundamentos teóricos.....	16
2.1. Cacao y su producción.....	16
2.2. Biomasa lignocelulósica	17
2.2.1. Celulosa.....	17
2.2.2. Hemicelulosa	18
2.2.3. Lignina	19
2.2.4. Otros Compuestos	20
2.3. Pretratamientos.....	20
2.3.1. Pretratamiento ácido	21
2.3.2. Pretratamiento alcalino	22
2.4. Producción de bioetanol	23
2.4.1. Hidrólisis Química.....	25
2.4.2. Hidrólisis enzimática	26
2.4.3. Fermentación y destilación	26
3. Métodos experimentales.....	27
3.1. Caracterización de materia prima	28
3.1.1. Contenido de humedad	28
3.1.2. Contenido de cenizas	29
3.1.3. Contenido de proteína.....	29
3.1.4. Contenido de grasa	31
3.1.5. Contenido de celulosa.....	32
3.1.6. Contenido de lignina.....	32
3.2. Pretratamientos.....	33
3.2.1. Pretratamiento con ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	33

3.2.2.	Pretratamiento con hidróxido de sodio (NaOH).....	33
3.2.3.	Pretratamiento con hidróxido de amonio (NH ₄ OH).....	33
3.2.4.	Pretratamiento con agua (H ₂ O).....	33
3.3.	Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	34
3.4.	Hidrólisis enzimática.....	34
3.5.	Estimación de azúcares.....	34
3.6.	Fermentación.....	34
3.7.	Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).....	35
3.8.	Análisis estadístico.....	35
4.	Resultados y discusión.....	36
4.1.	Caracterización inicial.....	36
4.2.	Pretratamientos a la mazorca de cacao.....	37
4.2.1.	Pretratamiento con ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄).....	37
4.2.2.	Pretratamiento con hidróxido de sodio (NaOH).....	38
4.2.3.	Pretratamiento con hidróxido de amonio (NH ₄ OH).....	39
4.2.4.	Pretratamiento con H ₂ O.....	40
4.3.	Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	46
4.4.	Azúcares después del pretratamiento.....	49
4.5.	Azúcares generados en la hidrólisis enzimática.....	50
4.6.	Producción de etanol.....	52
5.	Conclusiones y recomendaciones.....	55
6.	Anexos.....	57
7.	Referencias y bibliografía.....	59

Índice de Tablas

Tabla 2.1: Producción de cacao a nivel mundial 2017 [mil toneladas]	16
Tabla 2.2: Producción mundial de etanol en 2016	24
Tabla 4.1: Caracterización mazorca del cacao	36

Índice de Figuras

Figura 2.1 : Parte central de la cadena de celulosa	18
Figura 2.2: Unidades constituyentes de la hemicelulosa.....	19
Figura 2.3: Alcoholes cinámicos precursores de la lignina	19
Figura 2.4: Producción de etanol por biomasa lignocelulósica.....	25
Figura 2.5: Descripción de la metodología a seguir durante el estudio de producción de alcohol mediante el uso de biomasa de la mazorca del cacao.....	28
Figura 4.1: Concentración de celulosa y lignina después de pretratamiento con 2% v/v H ₂ SO ₄ , a diferentes tiempos.....	37
Figura 4.2: Concentración de celulosa y lignina después de pretratamiento con 2% p/v NaOH, a diferentes tiempos	39
Figura 4.3: Concentración de celulosa y lignina después de pretratamiento con 15% v/v NH ₄ OH, a diferentes tiempos	40
Figura 4.4: Concentración de celulosa y lignina después de pretratamiento con H ₂ O, a diferentes tiempos	41
Figura 4.5: Variación en la concentración de celulosa en el tiempo para diferentes pretratamientos de la biomasa lignocelulósica de la cáscara de la mazorca de cacao CCN51.....	42
Figura 4.6: Variación en la concentración de lignina en el tiempo para diferentes pretratamientos de la biomasa lignocelulósica de la cáscara de la mazorca de cacao CCN51.....	43
Figura 4.7: Rendimiento de los pretratamientos aplicados a la biomasa lignocelulósica de la cáscara de la mazorca de cacao CCN51, a diferentes tiempos	45
Figura 4.8: Microscopía electrónica de barrido a la biomasa de la mazorca de cacao a diferentes pretratamientos con un aumento de 500x. a) Sin pretratar, b)NaOH, c)NH ₄ OH, d)H ₂ SO ₄ , e)H ₂ O	46
Figura 4.9: Microscopía electrónica de barrido a la biomasa de la mazorca de cacao a diferentes pretratamientos con un aumento de 1000x. a)Sin pretratar, b)NaOH, c)NH ₄ OH, d)H ₂ SO ₄ , e)H ₂ O	47
Figura 4.10: Grados Brix después de diferentes pretratamientos a la biomasa lignocelulósica de la mazorca de cacao CCN51, a diferentes tiempos de reflujos	49
Figura 4.11: Comparación de la concentración de azúcares después de los pretratamientos a 4h de reflujo y después de la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica de la mazorca de cacao CCN51.....	51
Figura 4.12. Concentraciones de etanol obtenido después del proceso de fermentación de diferentes pretratamientos a la biomasa lignocelulósica de la mazorca de cacao ...	53
Figura 6.1. Sistema de reflujo para los pretratamientos a la mazorca de la cáscara de cacao	57
Figura 6.2. Sistema usado para la realización de una hidrólisis enzimática.....	57
Figura 6.3. Sistema usado para el proceso de fermentación alcohólica	58
Figura 6.4. Curva de calibración del GC-MS área vs. concentración de etanol	58

1. Introducción

1.1. Antecedentes

La fermentación alcohólica es una fermentación biológica que se lleva a cabo sin la presencia de oxígeno, en la cual microorganismos se encargan de procesar azúcares para la producción de alcohol. En dicho proceso se hace uso de levaduras y bacterias, las cuales, en su proceso metabólico, toman los azúcares como sustrato y desprenden etanol. En este tipo de fermentación, el piruvato es descarboxilado para convertirse en acetaldehído y a través de la enzima alcohol deshidrogenasa es reducido a etanol (1). Cualquier producto que contenga azúcares fermentables o hidratos de carbono como el almidón o celulosa sirven para la producción de alcoholes. La estructura de la pared celular de las plantas es compleja, debido a que está compuesta de fuertes uniones entre la celulosa y hemicelulosa con la lignina, la misma que se encarga de recubrir y proteger a dichos compuestos. Por esta razón, la conversión de la biomasa lignocelulósica en etanol es compleja y se requiere de pretratamientos que rompan dichas uniones lignocelulósicas, facilitando así los procesos de fermentación. Una variedad de técnicas de pretratamiento físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos, han sido desarrollados para mejorar la accesibilidad de los azúcares en las fibras celulósicas (2).

Existen diversos tipos de biomasa lignocelulósica que pueden ser utilizadas para la producción de etanol, tales como madera, cáscara de naranja, cáscara de piña, caña de azúcar, paja de trigo, maíz, entre otras. Una biomasa muy importante debido a su alta producción es la cáscara de cacao, lo que la convierte en un gran candidato para la producción de alcoholes. Sin embargo, esta tiene un gran contenido de celulosa y hemicelulosa, razón por la cual hasta el momento no ha sido utilizada con el fin de la producción de etanol.

Se han realizado diferentes estudios de pretratamientos a diferentes biomásas, para aumentar el rendimiento de estas en función de la cantidad de etanol producida. Uno de estos estudios fue ver los diferentes pretratamientos que se le puede dar a la biomasa de yuca como etapa previa para el proceso de hidrólisis enzimática; dando como resultado que el pretratamiento con hidróxido de sodio produce la mayor liberación de azúcares durante la hidrólisis enzimática del material vegetal. El NaOH causa un aumento de la

superficie interna de la celulosa y disminuye el grado de polimerización y cristalinidad, lo que provoca el rompimiento de la estructura de la lignina, mientras que, los pretratamientos con ácido sulfúrico y peróxido de hidrogeno no obtuvieron un alto rendimiento de etanol para este tipo de material vegetal (2).

Se han realizado estudios donde se aplica pretratamientos ácidos y básicos a biomásas como el pasto, donde se ha logrado hidrolizar a la celulosa en especial a la hemicelulosa, disminuyendo su concentración; por lo que se ha obtenido un rompimiento en los enlaces entre la lignina y la celulosa, aumentando la digestibilidad enzimática en la hidrólisis (3).

En otro estudio se comparó los diferentes pretratamientos alcalinos a la biomasa lignocelulósica de pasto de elefante y King Grass, para la recuperación de la fracción celulósica, remoción de lignina y producción de etanol mediante fermentación. Como resultado se obtuvo que el mejor pretratamiento se da cuando se trabaja con una concentración de NaOH 2% (p/v) a una temperatura de 120°C, obteniendo una recuperación de celulosa en el sólido entre 96,5% - 99%, y una remoción de lignina entre 76,2% - 88,4% con respecto al contenido inicial en el material sin pretratar, donde se obtuvo la concentración más alta de etanol para pasto elefante de 26,05 g/L (4).

Uno de los pretratamientos más utilizados en biomásas lignocelulósica es con ácido sulfúrico. Un estudio realizado para evaluar el pretratamiento de ácido sulfúrico del pasto maralfalfa, demostró que a una temperatura de 190°C y 2% (p/p) se hidroliza principalmente la hemicelulosa, disminuyendo su composición desde 22,54% en la biomasa sin pretratar hasta su totalidad, logrando el máximo porcentaje de celulosa en el material pretratado, correspondiente a 56,53% (p/p), obteniendo un aumento de la producción de etanol a 117mg/g de biomasa pretratada (5).

En base a lo descrito anteriormente, la cáscara de cacao presenta propiedades lignocelulósicas similares a las biomásas de los otros estudios, debido a la presencia de celulosa y lignina en su estructura; por lo que, para aprovechar estas características es necesario aplicar pretratamientos ácidos o básicos para así lograr acceder a la celulosa y hemicelulosa en los procesos de fermentación para la producción de etanol.

1.2. Justificación del proyecto

El propósito de este proyecto es mejorar las características de la biomasa de la cáscara de cacao para aumentar la producción de bioetanol por medio de la fermentación de ésta. Implementando los pretratamientos más comunes usados en otras biomásas como en la cáscara de plátano, yuca, madera, a través de ácidos y bases, determinando cuál de estos pretratamientos generan una mayor tasa de producción de bioetanol.

El cacao es una de las materias primas más usadas a nivel mundial, debido a la alta demanda que este presenta para la producción de chocolate. El chocolate, es uno de los productos más consumidos a nivel mundial debido a su sabor y ha ganado su atención por sus propiedades antioxidantes que ayudan a reducir enfermedades cardiovasculares y protege contra algunos tipos de cáncer (6).

De acuerdo con la Asociación Nacional de Exportadores de Cacao del Ecuador, por sus condiciones geográficas, el Ecuador es uno de los mayores productores de cacao; teniendo dos tipos diferentes de especies, el cacao nacional y el CCN51. Del total de la exportación ecuatoriana se tiene que el 75% es cacao fino y el 25% restante pertenece al CCN51(7), el mismo que es el que genera la mayor cantidad de residuos, debido al gran tamaño de su mazorca. La producción de cacao en los últimos años ha tenido un crecimiento exponencial, teniendo un aumento del 14,3% de sus exportaciones (8).

El producto que se usa del cacao es el grano, el cual pasa por procesos de lavado, tostado, descascarillado y molienda para el posterior empleo en la fabricación de chocolate de todo tipo. Durante este proceso de preparación del grano, se genera una cantidad alta de residuos ya que en la exportación cacaotera solo se aprovecha económicamente la semilla. El proceso de descascarillado supone una pérdida de entre 17 kg a 20 kg por cada 100 kg de cacao al eliminar la mazorca del mismo (9). En el 2015, Ecuador cultivó 264 mil toneladas de cacao (10) lo que representa alrededor de 1'320.000 toneladas de residuos. Debido a esto, la búsqueda de alternativas para reutilizar este residuo es de gran importancia, al tener un gran impacto medio ambiental. Generalmente para la producción de bioetanol se usan biomasa de papa, yuca, caña de azúcar, entre otros; pero no se ha pensado en la utilización de esta biomasa, la cual es de gran

abundancia, en especial en países con una producción elevada de cacao como lo es Ecuador.

La cáscara de cacao ha sido usada principalmente para la alimentación animal, pero debido a su alto contenido de teobromina restringe la proporción en que puede ser consumida, por lo que es limitado en comparación a la gran cantidad de desechos generados. Otra forma en que se aprovecha este desecho es dejándolo en campo y usarlo como abono sin compostar, pero esto trae problemas al cultivador debido a que se convierte en una fuente significativa de enfermedades causada por varias especies del género *Phytophthora* (11). Este proyecto brinda una alternativa para el uso de esta cáscara como biomasa para la producción de bioetanol debido a que contiene gran cantidad de azúcares reductores, tales como la glucosa, xilosa y celobiosa, haciendo que la biomasa desechada tenga un fin útil y rentable a nivel económico y ambiental.

Para la producción de etanol se deben implementar pretratamientos de la biomasa, ayudando así al proceso de fermentación, debido a que las biomásas lignocelulósicas tienen una alta concentración de celulosa y lignina, donde la lignina evita que se tenga acceso a los azúcares reductores presentes en la biomasa. Con la ayuda de los pretratamiento se hidroliza la celulosa y hemicelulosa, y se disminuye la concentración de lignina, facilitando la obtención de dichos azúcares durante la fermentación alcohólica (5). Por lo tanto, en este proyecto se va a estudiar los diferentes métodos de pretratamiento de la biomasa de la cáscara de la mazorca de cacao mediante pretratamientos con ácido sulfúrico, hidróxido de amonio, hidróxido de sodio y agua; los mismo que son una ruta biológica que rompen las cadenas de lignina y celulosa para liberar los azúcares que van a ser fermentados para la producción de etanol. Estos pretratamientos reducen de manera económica el uso de enzimas en estos procesos de fermentación, como también ayudan al aprovechamiento de los residuos de diferentes productos, en este caso del cacao.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivos generales

Evaluar los efectos de diferentes pretratamientos con ácido sulfúrico, hidróxido de sodio, hidróxido de amonio y agua en la cáscara de la mazorca de cacao sobre la producción de etanol en procesos fermentativos.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar fisicoquímicamente la cáscara de cacao antes de ser pretratada
2. Realizar pretratamientos ácidos y básicos a la mazorca de cacao, bajo diferentes condiciones
3. Caracterizar fisicoquímicamente la biomasa después de los diferentes pretratamientos
4. Determinar el pretratamiento de biomasa más adecuado para la obtención de bioetanol en procesos de fermentación alcohólica

2. Fundamentos teóricos

2.1. Cacao y su producción

La producción de cacao es de significativa importancia debido a que constituye la base de la economía nacional de países productores (12). Este fruto es la materia prima de diferentes productos industriales, de las almendras del cacao se pueden obtener subproductos como pasta o licor, manteca, torta y polvo de cacao; mientras que, como productos finales se obtienen principalmente chocolates y todos sus derivados (12).

La demanda mundial de cacao y de manteca de cacao es impulsado por el mercado mundial de productos de confitería de chocolate. Esta demanda está cubierta por países cuya banda geográfica se encuentra cerca de la línea ecuatorial debido a las exigencias climáticas y de precipitaciones (13). De acuerdo con la Organización Internacional de Cacao (ICCO), los mayores productores de cacao a nivel mundial son los países de África: Camerún, Costa de Marfil, Ghana y Nigeria; en la sector de América: Brasil, Ecuador y Colombia, y en Asia el mayor productor es Indonesia (14).

Tabla 2.1: Producción de cacao a nivel mundial 2017 [mil toneladas](14)

	2014/15		Estimates 2015/16		Forecasts 2016/17	
Africa	3074	72.3%	2918	73.3%	3565	75.8%
Cameroon	232		211		240	
Côte d'Ivoire	1796		1581		2010	
Ghana	740		778		950	
Nigeria	195		200		225	
Others	111		148		140	
America	777	18.3%	666	16.7%	757	16.1%
Brazil	230		140		180	
Ecuador	261		232		270	
Others	286		294		307	
Asia & Oceania	400	9.4%	397	10.0%	379	8.1%
Indonesia	325		320		290	
Papua New Guinea	36		36		40	
Others	39		41		49	
World total	4251	100.0%	3981	100.0%	4700	100.0%

Como se puede observar en la tabla 2.1 Ecuador se encuentra entre los diez principales países productores de cacao a nivel mundial, esto se debe a diferentes factores que han hecho que Ecuador vaya escalando de posiciones. En el 2014 se podaron cientos de hectáreas para mejorar los rendimientos de los cultivos, incluyendo la poda de 100 mil hectáreas cacaoteras (15). Otra de las ventajas que tiene Ecuador a nivel mundial, es que

produce dos tipos de Cacao: Cacao Fino de Aroma o Nacional y el Cacao CCN-51, teniendo como principal cliente a Estados Unidos, con 26% de las exportaciones (8).

El Cacao Fino de Aroma o Nacional es un cacao de color amarillo, posee un sabor y aroma único, que lo convierte en un cacao muy cotizado para la producción de chocolates gourmet a nivel mundial (16). Por otra parte, el cacao CCN-51 cuyo color característico es el rojo, es conocido por su alto rendimiento, ya que posee una capacidad productiva cuatro veces mayor a las clásicas producciones y a su vez es muy resistentes a las enfermedades (7). Este tipo de cacao presenta un inconveniente debido a su tamaño, ya que es tres veces mayor a comparación con el cacao nacional, por lo que este presenta una mayor cantidad de mazorca, haciendo que más de la mitad de su peso sea mazorca que se convierte en residuo orgánico, mientras que el grano es usado como materia prima para diferentes procesos.

2.2. Biomasa lignocelulósica

Gran cantidad de desechos agroindustriales, que en su mayoría entran dentro de la categoría de biomasa lignocelulósica, han dejado de ser desechos para convertirse en la materia prima de diversos procesos industriales y biotecnológicos. Entre sus principales enfoques esta la producción de biocombustibles, como alcoholes, siendo el más estudiado el etanol (etanol).

Según la Especificación Técnica Europea CEN/TS 14588, se define como biomasa a “todo material de origen biológico excluyendo aquellos que han sido englobados en la formaciones biológicas sufriendo un proceso de mineralización” (17), es decir son productos biológicos formados a partir de materia biológica, siendo un grupo de productos energéticos y materia primas usados en diferentes procesos.

La biomasa lignocelulósica es una matriz compuesta por ésteres extraíbles tales como la cera y lípidos, proteínas, lignina y carbohidratos. Los carbohidratos pueden ser solubles como la sacarosa y fructosa, y no estructurales como la celulosa y hemicelulosa (3). La biomasa lignocelulósica se caracteriza por ser rica en polímeros de celulosa y hemicelulosa, los cuales corresponde entre 75-80% de su estructura (1).

2.2.1. Celulosa

La celulosa es un polisacárido, que sirve como base estructural de las células vegetales. Este es un polímero homogéneo lineal, de elevado peso molecular, constituido de largas cadenas de D-glucosa en forma de piranosa unidas por enlaces β -1,4-

glucosídico (17), dando lugar a la unidad de celobiosa, la misma que es la unidad más pequeña que se repite exactamente en toda la cadena polimérica, tal como se muestra en la figura 2.1. La celulosa tiene una estructura cristalina, cuyas zonas de mayor cristalinidad son más difíciles de hidrolizar en sus unidades monoméricas, a comparación con las zonas de menor cristalinidad, las mismas que son de fácil acceso y susceptibles a reacciones químicas (3).

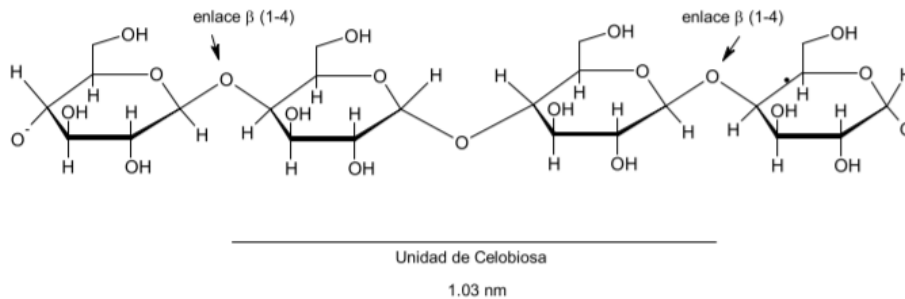


Figura 2.1 : Parte central de la cadena de celulosa(17)

Los puentes de hidrógeno también se forman entre los grupos hidroxilo de la celulosa y las moléculas de agua, haciendo la superficie de la celulosa altamente hidrofílica. Ayudando de la misma manera al grado de polimerización (GP) de la celulosa, el cual varía entre 1000 y 10000 dependiendo de la fuente lignocelulósica y las condiciones ambientales (3).

2.2.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa es un heteropolisacárido compuesto fundamentalmente de xilosa, arabinosa (pentosas), galactosa, glucosa y manosa (hexosas) y pequeñas cantidades de ramnosa, ácido glucurónico, y galacturónico (3), cuya función principal es mantener la unión entre la lignina y la celulosa en el compuesto lignocelulósico. Estos compuestos no son químicamente homogéneos y se diferencian de la celulosa por su monómero constituyente. La estructura de la hemicelulosa consiste en un único azúcar, homopolímero, o de dos o más azúcares, heteropolímero (17). En la figura 2.2 se pueden observar las diferentes unidades constituyentes de la hemicelulosa.

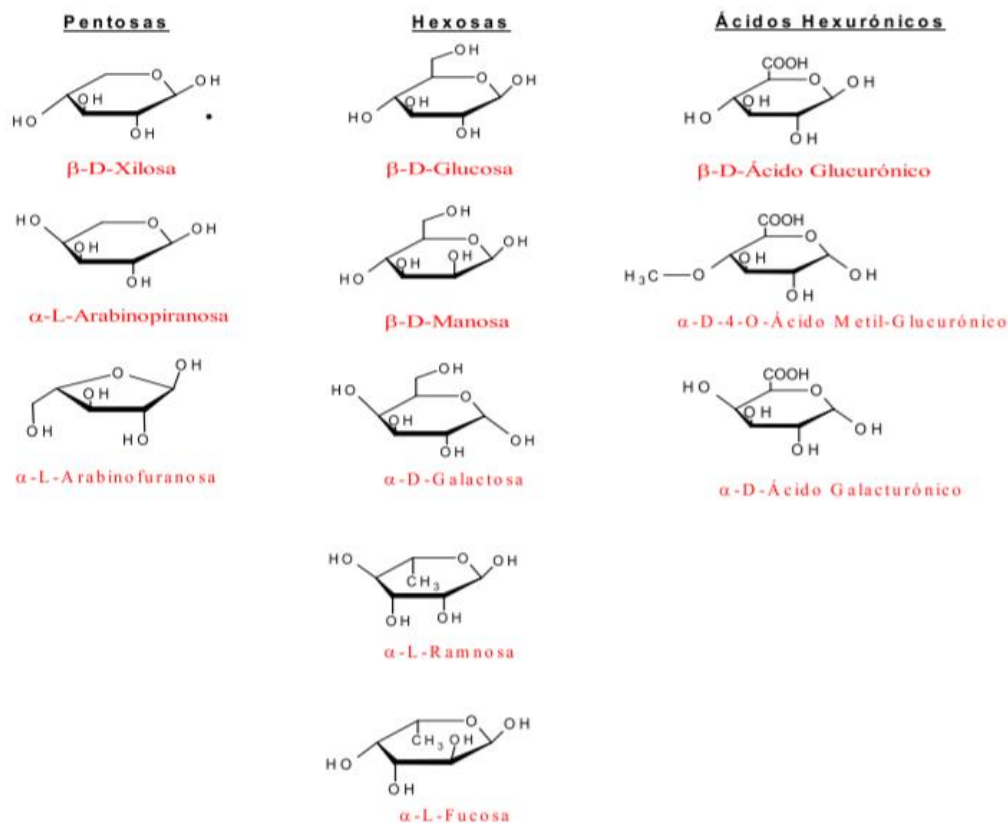


Figura 2.2: Unidades constituyentes de la hemicelulosa(17)

2.2.3. Lignina

La lignina es un heteropolímero amorfo que no es soluble en agua, haciendo que su descomposición sea muy complicada. La lignina se encuentra formada por unidades monoméricas denominadas alcoholes: p-cumarílico, coniferílico y sinapílico, formándose a partir de la deshidrogenación enzimática de estos (3); la estructura de dichos alcoholes se pueden observar en la figura 2.3. Las principales funciones de la lignina son el transporte interno de agua, nutrientes y metabolitos; y brindar rigidez a la pared celular, mediante el endurecimiento de las fibras de polisacáridos (1).

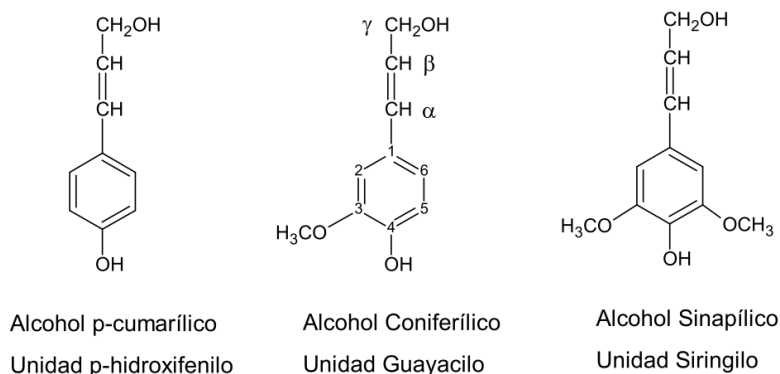


Figura 2.3: Alcoholes cinamílicos precursores de la lignina(17)

Se puede distinguir dos tipos de lignina, las mismas que se basan en su nivel de polimerización. La lignina más polarizada forma una matriz que es difícil de penetrar debido a su nivel de condensación, mientras que la matriz menos polarizada es la que se encuentra unida a la hemicelulosa, debido a su menor impedimento estérico, la misma que se une a la celulosa (17). Debido a que la lignina protege a los compuestos de la biomasa por su matriz de compleja penetración, provoca que al momento de implementar un bioproceso mediante microorganismo, no puedan absorber los nutrientes presentes, provocando que el bioproceso falle. Un ejemplo de aquello es la producción de etanol, en donde al momento de la hidrólisis enzimática, las enzimas no pueden aprovechar la celulosa presente en esta biomasa, ocasionando que, durante la fermentación, las levaduras no tengan azúcares simples que absorber para fermentar y así producir etanol.

2.2.4. Otros Compuestos

Bajo esta categoría se incluyen a los compuestos denominados “extractivos”, debido a su heterogeneidad y falta de orden. A este grupo pertenecen compuestos orgánicos, tales como: grasas, ceras, alcaloides, proteínas, fenoles, azúcares reductores, pectina, gomas, resinas, entre otros (17). Otro grupo de componentes son las sales inorgánicas, conocidas más como cenizas, responsables de la formación de carbonatos, fosfatos y oxalatos. Todos estos compuestos previamente mencionados brindan las características de la biomasa, es decir, su color, olor y resistencia.

2.3. Pretratamientos

La biomasa lignocelulósica a diferencia de otras materias con altos contenidos de azúcares accesibles tiene una estructura que impide el fácil acceso a la celulosa y hemicelulosa, debido a la presencia de una matriz generada por la lignina, la cual recubre y protege a estos compuestos. Por lo que es necesario realizar un pretratamiento para poder conseguir fracciones hidrolizables para la obtención de azúcares que posteriormente puedan ser fermentadas (18).

En una biomasa lignocelulósica, sus fibras presentan celulosa con una alta cristalinidad, las cuales se encuentran dentro de una matriz de hemicelulosa no muy bien organizada y, a su vez, envuelta en una pared de lignina que le da la rigidez (4). Por lo que, el pretratamiento busca la despolimerización de lignina y hemicelulosa, aumentando la concentración de celulosa y haciendo que se reduzca la cristalinidad de la misma; toda esto provoca una alteración en la estructura de la lignina para mejorar la accesibilidad de

las enzimas a las celulosas para convertir los carbohidratos estructurales en monosacáridos fermentables (5). Los pretratamientos son considerados pasos claves para la producción de alcohol, ya que estos procesos permiten un mayor acceso a azúcares, aumentando así la cantidad de alcohol que se va a producir en base a este material lignocelulósico. Existen diversos tipos de pretratamientos, entre los utilizados en la industria son los pretratamientos con ácidos diluidos y los pretratamientos alcalinos.

Los pretratamientos se pueden clasificar en biológicos, químicos y físicos. Los biológicos ofrecen ventajas importantes como el bajo consumo energético, debido a la utilización de hongos que degradan la lignina y la hemicelulosa, y a su vez reduciendo la contaminación ambiental, ya que se utilizan organismos que se encuentran en la naturaleza y no sustancias químicas sintéticas que generan un problema al medio ambiente. El inconveniente de estos procesos es que requieren más tiempo que los pretratamientos químicos y físicos. Entre tanto, los pretratamientos físicos, están basados en la reducción del tamaño de la biomasa, logrando bajos rendimientos a costos elevados. Los pretratamientos con adición de químicos son los más efectivos; sin embargo, no todos los pretratamientos químicos presentan un balance adecuado entre las ventajas ofrecidas y el costo de operación (5).

2.3.1. Pretratamiento ácido

El pretratamiento ácido es un proceso químico que busca solubilizar a la hemicelulosa para poder acceder a la celulosa. La hidrólisis ácida de los materiales lignocelulósicos es un proceso que se desarrolló en 1819 durante las dos Guerras Mundiales, debido a la escasez de petróleo, produciendo etanol a partir de la madera (19).

La principal reacción que ocurre durante este pretratamiento es la hidrólisis de la hemicelulosa, especialmente del xilano. Sin embargo la hemicelulosa solubilizada puede ser objeto de reacciones hidrolíticas y producir monómeros como el fúrfural (2). Por otra parte, la lignina se solubiliza rápidamente separándole de la celulosa, permitiendo más accesibilidad a los azúcares.

El pretratamiento por ácido involucra el uso de ácido nítrico, sulfúrico o clorhídrico, de los cuales los más utilizados a escala industrial son los ácidos clorhídrico y sulfúrico. Los procesos industriales de hidrólisis ácida se pueden agrupar en dos tipos: los que emplean ácidos concentrados y ácidos diluidos (20).

Los procesos con ácidos concentrados operan a temperaturas moderadas entre 120°C-160°C, lo que aumenta el rendimiento de la hidrólisis, obteniendo una hidrólisis superior al 90% de la glucosa (19). Pero se tiene desventajadas cuando se utiliza un ácido tan concentrado, debido a que el ácido tiene efectos corrosivos, por lo que la inversión en equipos es alta, así como también la gran cantidad de ácido que se requiere para tratar esta materia (17). Otra de las desventajas es con relación al medio ambiente, ya que al ser un ácido concentrado, este puede afectar el pH tanto del agua residual como de suelo, disminuyendo el nivel de vida de las especies en contacto y aumentando la toxicidad de otros contaminantes que pueden estar presentes, haciendo que este proceso no sea rentable (21).

Por otra parte, los procesos con ácidos diluidos tienen un bajo consumo de ácido, pero es necesario operar a temperaturas relativamente altas entre 160°C-200°C para que el rendimiento de celulosa a glucosa sea aceptable para el empleo de este método (19). El pretratamiento con ácido diluido ha sido altamente usado debido a que aumenta la hidrólisis de la celulosa significativamente y a la vez el costo de inversión en equipos y reactivos se ve altamente reducido (17).

2.3.2. Pretratamiento alcalino

El pretratamiento alcalino consiste en la utilización de soluciones alcalinas con el objetivo de remover la lignina y varias sustituciones de ácidos urónicos que impiden la accesibilidad de las enzimas, como la celulasas, a la celulosa del material lignocelulósico (2).

La solución alcalina más utilizada es la hidróxido de sodio diluida, la misma que produce un hinchamiento de la biomasa, haciendo que el área superficial interna aumente, disminuyendo la cristalinidad, y obteniendo así un ruptura entre las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos, para producir una ruptura en la estructura de la lignina (19). La efectividad de este pretratamiento se basa en la cantidad de lignina del material a tratar, es decir, entre menor contenido de lignina contenga el material, mayor será la efectividad del proceso (22).

El mecanismo de hidrólisis alcalina se basa en la saponificación de los enlaces de éster que atraviesan los xilanos en la hemicelulosa y otros componentes como la lignina (4); teniendo así una disminución en el grado de polimerización y cristalinidad debido a la remoción de los enlaces entre la lignina y los carbohidratos.

A parte de los pretratamientos ácidos y básicos, existen otros pretratamientos químicos utilizados en biomásas lignocelulósicas. La ozonólisis es un pretratamiento que degrada la lignina y hemicelulosa, cuyas condiciones de operación son ozono, temperatura y presión ambientales, teniendo como desventaja la gran cantidad de ozono que este pretratamiento necesita, lo cual aumenta significativamente el costo de producción (22). Otro pretratamiento es el proceso organosolv, el cual consiste en la implementación de solventes orgánicos, como metanol, acetona, etilenglicol, mezclados con ácidos inorgánicos (HCl o H₂SO₄), para así romper la pared de lignina y los enlaces de hemicelulosa; como desventaja es que se debe reciclar los solventes, provocando que con el tiempo el rendimiento de este pretratamiento vaya reduciéndose (4). Finalmente, el proceso de deslignificación oxidativa consiste en romper y solubilizar la lignina mejorando así la digestibilidad de las enzimas, este proceso se lleva a cabo mediante la adición de un oxidante, como el peróxido de hidrogeno, en la biomasa suspendida en agua. El problema es que no es un proceso selectivo, por lo que una gran cantidad de azúcares se pierden en este pretratamiento (2).

2.4. Producción de bioetanol

El etanol es un compuesto formado por dos átomos de carbono que se encuentran unidos por un enlace simple, donde uno de los carbonos tiene un grupo hidroxilo (23). El bioetanol se extrae mediante la fermentación de azúcares que se encuentran en diferentes biomásas lignocelulósicas, mientras que el etanol se lo obtiene mediante el craqueo de petróleo a presión o por hidratación en presencia de sales minerales (24). El bioetanol presenta un menor impacto ambiental y a su vez nos permite aprovechar residuos que son considerados biomásas desvalorizadas, reduciendo así la contaminación (25).

En la actualidad debido a la contaminación y el cambio climático, como también el consumo elevado de fuentes no renovables como el petróleo para la producción de energía, se ha buscado alternativas, las cuales implican la utilización de biomásas residuales para la producción de biocombustibles, principalmente el bioetanol.

Un gran desperdicio a nivel de la industria agro-alimentaria son las biomásas lignocelulósicas, las mismas que tienen un gran contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina. Debido a la celulosa y hemicelulosa que tienen estas biomásas son un buen candidato para la producción de etanol, el cual es un combustible alternativo obtenido de la fermentación de estas materias primas que contienen hidratos de carbono, permitiendo

sustituir a la gasolina en los motores de encendido por chispa (26). El bioetanol presenta mayor rendimiento que la gasolina, debido a características como: contener un mayor octanaje comparado con el de la gasolina, posee un rango de inflamabilidad más amplio, llamas más grandes y altos calores de vaporización. Una de las características más importantes del bioetanol es su papel como oxigenante de las gasolinas, ya que aumenta la eficiencia de la combustión, reduciendo productos secundarios, como son el monóxido de carbono e hidrocarburos (27); de la misma manera, permite sustituir compuestos potencialmente cancerígenos, como son el MTBE (metil-ter-butil-éter) (28). Debido a todas las ventajas que el bioetanol posee como combustible, las industrias y países a nivel mundial están realizando sus estudios para la producción de bioetanol. En la tabla 2.2 se puede observar la cantidad producida en galones de bioetanol del 2016 a nivel mundial.

Tabla 2.2: Producción mundial de etanol en 2016 (27)

Región	Millones de Galones
Estados Unidos	15,329
Brasil	7,295
Unión Europea	1,377
China	845
Canadá	436
Tailandia	322
Argentina	264
India	255
Resto del Mundo	490

En la producción de bioetanol se llevan a cabo varios procesos físicos, químicos y biológicos, los cuales se pueden observar en la figura 2.4. Primero la biomasa lignocelulósica requiere un pretratamiento para tener acceso a la celulosa, eliminando la lignina, la misma que es un inhibidor de los procesos de fermentación. Luego del pretratamiento, se realiza una hidrólisis enzimática, para finalmente realizar una fermentación empleando levaduras y finalmente una destilación (29). El proceso de producción de bioetanol se realiza a través de la fermentación anaeróbica de azúcares combinados en forma de sacarosa, almidón, celulosa y hemicelulosa, por medio de microorganismos (30).

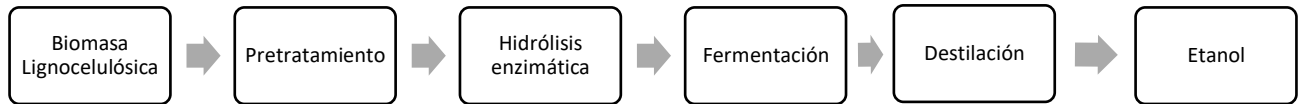
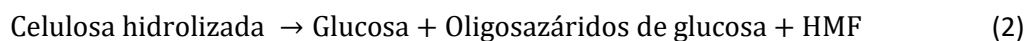


Figura 2.4: Producción de etanol por biomasa lignocelulósica

La hidrólisis es un proceso mediante el cual se transforman los polisacáridos del material lignocelulósico en azúcares simples, los cuales a su vez son fermentables para la producción de alcoholes, en este caso bioetanol (20). Las transformaciones que sufren la hemicelulosa y la celulosa a azúcares más simples están dadas por las ecuaciones 1 y 2, donde los azúcares simples que se forman principalmente son la xilosa y la glucosa.



La mayoría de los métodos de hidrólisis empleados en la producción de bioetanol se dividen en dos grandes grupos: hidrólisis química e hidrólisis enzimática.

2.4.1. Hidrólisis Química

La hidrólisis química consiste en exponer el material lignocelulósico previamente tratado a una sustancia química por un periodo de tiempo y a una temperatura determinado, obteniendo monómeros de azúcar provenientes de la celulosa y hemicelulosa (20). Este proceso generalmente se trabaja con ácidos o compuestos alcalinos, pero el más usado es el ácido, en el cual se tienen dos tipos de procesos:

- **Hidrólisis con ácido diluido:** Generalmente se usa concentraciones de ácido sulfúrico bajas de entre 1-2% p/p, en tiempos de residencias determinados en reactores agitados, se tiene que tener en cuenta, que en este tipo de hidrólisis, la concentración de sólidos es alta como también su temperatura (31).
- **Hidrólisis de ácido concentrado:** Se emplea una solución ácida con una concentración de entre 10-30% p/p y sus tiempos de reacción son más largos que la hidrólisis con ácido diluido (20). Este proceso tiene una rápida conversión de la celulosa en glucosa y la hemicelulosa en pentosa, pero el problema es su alta corrosión debido a la concentración del ácido, por lo que no es económicamente rentable.

- **Hidrólisis básica:** Generalmente se usa concentraciones de hidróxido de sodio o de calcio bajas entre 1-2%p/p, en tiempos de residencia cortos debido a que es una base fuerte. Esta hidrólisis cumple la función de la saponificación de los enlaces ésteres intramoleculares que unen los componentes de la materia prima, provocando así rupturas de enlaces, principalmente los formados entre las ramificaciones del componente hemicelulósico y la lignina (17).

2.4.2. Hidrólisis enzimática

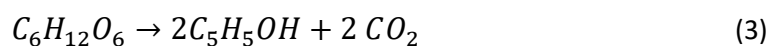
La hidrólisis enzimática es un procesos catalizado por enzimas, que tiene como objetivo la degradación de la celulosa (22). Se caracteriza por la presencia de una reacción catalítica, la cual posee un reactivo insoluble, que es la celulosa y un catalizador soluble que es la celulasa (20). Este proceso genera azúcares reductores incluyendo la glucosa y la velocidad de dicha reacción depende de la estructura de la celulosa en el material lignocelulósico y por el modo de acción que las enzimas presenten. Este proceso se enfoca en la transformación de la celulosa en glucosa, ya que este componente queda expuesto al ataque enzimático debido al pretratamiento realizado previamente, y se enfoca en la hidrólisis de la hemicelulosa que no se logró hidrolizar con dicho pretratamiento (22).

Las ventajas de la hidrólisis enzimática son que proporcionan altos rendimientos, reduciendo los inhibidores de fermentación, pero a la vez es un proceso lento, el cual toma alrededor de 72 horas en comparación de la hidrólisis química, la cual es un proceso de alrededor de 2 horas (30).

Una vez realizada la hidrólisis de los compuestos que forman el material lignocelulósico, se procede a realizar la fermentación de los azúcares previamente obtenidos.

2.4.3. Fermentación y destilación

La fermentación alcohólica es una reacción que permite degradar azúcares en etanol y dióxido de carbono de acuerdo a la siguiente reacción (20).



La reacción previamente mostrada se lleva a cabo por microorganismos. A nivel industrial los más utilizados son las levaduras, las cuales son de acción lenta en el

proceso de fermentación, pero son las más usadas para la producción de etanol, debido a su productividad, baja producción de inhibidores y facilidad de separación después de la fermentación (22), haciendo del proceso económicamente rentable.

En estos procesos se tiene una gama de levaduras que pueden ser utilizadas para la fermentación de azúcares, tales como las levaduras de los géneros “*Candida* (seudotropicalis), *Saccharomyces* (ceresviceae, ellipsoideus, anamensisi, carlsbergensis) y *Kluyveromyces marxianus* y *fragilis*” (22). Pero el género que más se utiliza especialmente en la producción de alcohol es la *Saccharomyces cerevisiae*; esta levadura es usada a nivel industrial debido a que ha demostrado que es un microorganismo robusto y adecuado para la fermentación cuando se emplean hidrolizados lignocelulósicos (20).

Finalmente, para separar la mezcla de bioetanol y agua, y así poder usarlo como combustible, se debe realizar un proceso de destilación, el mismo que se basa en el punto de ebullición de los compuestos de la solución. El etanol tiene un punto de ebullición de 78.3°C, mientras que la del agua es de 100°C, por lo que la mezcla se calienta hasta que se evapora y condense el alcohol (30).

3. Métodos experimentales

Para la caracterización de materia prima, antes y después de cada pretratamiento, se realiza una determinación porcentual de humedad, cenizas, grasa, proteína, lignina y celulosa. Se van a realizar cuatro tipos de pretratamientos usando ácido sulfúrico, hidróxido de sodio, hidróxido de amonio y agua, en los cuales se va a variar el tiempo de pretratamiento, para posteriormente determinar el cambio que estos producen en la concentración de celulosa y lignina presente en la biomasa. Finalmente se realiza una hidrólisis enzimática para una posterior fermentación para cada uno de los pretratamientos y realizando una cromatografía de gases con espectrometría de masa para determinar la cantidad presente de etanol. En la figura 2.5 se puede observar los pasos a seguir del estudio.

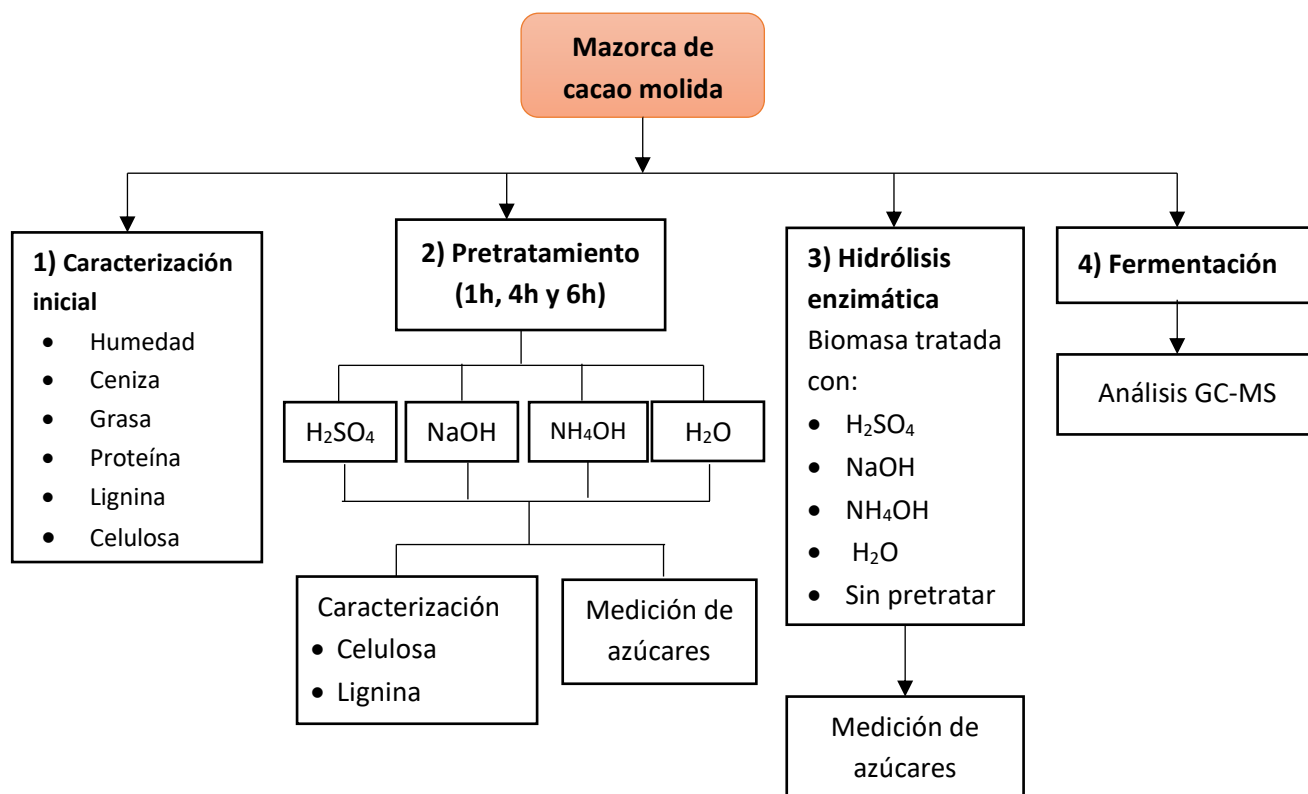


Figura 2.5: Descripción de la metodología a seguir durante el estudio de producción de alcohol mediante el uso de biomasa de la mazorca del cacao

Los protocolos para cada uno de los análisis se basan en los métodos del Manual de procedimientos y seguridad IDEMA (32), los mismos que son adaptaciones del libro de métodos oficiales de análisis de la AOAC Internacional (33).

3.1. Caracterización de materia prima

3.1.1. Contenido de humedad

El contenido de humedad está definido como la cantidad de agua presente en una biomasa, es decir, la relación entre agua y la materia seca. Esta agua se puede encontrar ligada a las proteínas y a las moléculas de sacárido del material (34)

El contenido de humedad de la muestra se lo determinó por el método gravimétrico de acuerdo con el método AOAC 934.01, en el cual se colocaron 1g de la muestra triturada en crisoles previamente secados y pesados. Una vez colocada la muestra en los crisoles, se la sometió a un proceso de secado en una estufa a 105°C para evaporar el agua libre, hasta que se alcance un peso constante (33). Finalmente se pesó los crisoles nuevamente y se determinó el contenido de humedad mediante la ecuación 4.

$$\%Humedad = \left[\frac{Mf-Mc}{Mi-Mc} \right] \times 100\% \quad (4)$$

Donde:

Mf: Peso del crisol con la muestra seca [g]

Mi: Peso del crisol con la muestra inicial [g]

Mc: Peso del crisol seco y vacío [g]

3.1.2. Contenido de cenizas

Las cenizas totales corresponde a los residuos inorgánicos que se pueden determinar mediante la incineración del material estudiado, estos residuos corresponden a sales de calcio, magnesio y potasio que quedan después de la incineración del material orgánico como las proteínas, carbohidratos y lípidos (35).

El contenido de cenizas de la muestra se lo determinó por un método gravimétrico de acuerdo con el método AOAC 932.01, en el cual se colocó 1g de la muestra triturada en crisoles previamente secado y pesados. Una vez colocada la muestra en los crisoles, estos se los ingresó en una estufa a 105°C durante 5 horas para eliminar toda el agua libre, posteriormente se los calcinó en una mufla a 540°C durante 5 horas, eliminando la materia orgánica de la muestra (33). Finalmente se pesó los crisoles nuevamente y se determinó el contenido de cenizas mediante la ecuación 5.

$$\%Cenizas = \left[\frac{Mf-Mc}{Mi-Mc} \right] \times 100\% \quad (5)$$

Donde:

Mf: Peso del crisol con la muestra calcinada [g]

Mi: Peso del crisol con la muestra inicial [g]

Mc: Peso del crisol seco y vacío [g]

3.1.3. Contenido de proteína

El método de Kjeldahl determina la cantidad de nitrógeno y proteína presente en dicha materia. Este método consiste en tres etapas: Digestión, destilación y titulación (36).

La digestión constituye en la descomposición del nitrógeno de la muestra analizada mediante el uso de una solución de ácido sulfúrico concentrado, donde se incluye sulfato sódico para aumentar el punto de ebullición y sulfato de cobre como catalizador, en esta parte del proceso el nitrógeno orgánico es transformado en amoníaco. En la destilación, el amoníaco es destilado y se lo retiene en una solución de ácido bórico; finalmente en la titulación se cuantifica la cantidad de amoníaco en la solución destilada. La cantidad de nitrógeno en la muestra se puede calcular de la cantidad cuantificada de iones de amoníaco en la solución y para convertir el nitrógeno en proteína se emplea el factor de 6.25, el cual considera que las proteínas tienen una cantidad aproximada de 16% en peso de nitrógeno (36).

Para la determinación de la cantidad de proteína se implementó dicho método usando un digestor DK6 VLEP Scientifica y unidad de destilación semiautomática UDK 139, basándose en el método de análisis de la AOAC 960.52 (33).

Para la digestión, se usó un catalizador de 9g de sulfato de potasio (K₂SO₄) y 1g de sulfato de cobre (CuSO₄). Para el procedimiento, se pesaron 0.5g de la muestra seca y se añadieron 2 pastillas de catalizador en un balón de digestión de 100ml, luego se añadieron 13ml de ácido sulfúrico al 97%. Los balones de digestión se calentaron hasta que la digestión se complete, la cual se observa cuando el medio se torna de color claro azulado. El producto de la digestión se hizo reaccionar con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 40%, se lo calentó y destiló. El destilado se recibió sobre 25ml de solución de ácido bórico (H₃BO₃) al 4% hasta duplicar su volumen. Finalmente, se tituló con la solución estandarizada de ácido clorhídrico (HCl) 0.01M, utilizando como indicador verde de bromocresol. A partir del volumen de ácido clorhídrico utilizado para la titulación se calculó el porcentaje de proteína mediante la ecuación 6 (33).

$$\%Proteína = \left[\frac{V \times C_{HCl} \times MW_{N_2}}{Mi} \times f \right] \times 100\% \quad (6)$$

Donde:

V: Volumen de HCl utilizado para la titulación de la muestra [ml]

C_{HCl} : Concentración de ácido clorhídrico HCl $\left[\frac{mol}{L} \right]$

MW_{N_2} : Peso molecular del nitrógeno N₂ $\left[\frac{g}{mol} \right]$

Mi: Peso inicial de la muestra [g]

f: Factor de proteína (6.25) [-]

3.1.4. Contenido de grasa

Para la determinación de la cantidad de grasa se emplea comúnmente el método de extracción semicontinua Soxhlet. Este es un método de extracción sólido-líquido que consta de tres procesos físicos: vaporización, condensación y extracción (37), donde se ocupa un solvente de bajo punto de ebullición, como es el hexano. En la determinación de grasas y aceites no se mide una cantidad absoluta, ya que comprende cualquier material recuperado como una sustancia soluble en el solvente (38).

El contenido de grasa de la muestra se lo determinó por el método de Randall, el mismo que es un método derivado del método de Soxhlet de acuerdo con las normas AOAC 2003.05 y AOAC 2003.06 (39). La extracción se la realizó con un solvente orgánico en el equipo Extractor de Solvente, VLEP Scientifia SER 148. Se preparó un cartucho de celulosa, en el cual se pesó 1g de la muestra seca; luego el cartucho se insertó en el tubo extractor, el cual está conectado con el balón extractor y este tubo al condensador. El balón contiene 200 ml de hexano como solvente orgánico, se lo sometió a calentamiento para así volatilizar dicho solvente, llevando a cabo el proceso de extracción. Este proceso tuvo una duración de 8 horas, luego del cual el solvente fue recuperado; para esto, se retiró el cartucho del tubo extractor y se recuperó el solvente libre de la muestra en el balón (40).

Posteriormente el balón fue llevado a un rotavapor, mediante el cual se lo sometió a un calentamiento indirecto al sumergirlo en agua caliente. El hexano se evaporó y se lo recuperó mediante el tubo condensador. El restante del líquido en el balón representa la fracción lipídica presente en la muestra y su peso se obtiene por diferencia entre el peso final del balón con el residuo y el peso del balón vacío. Se determinó el contenido de grasa mediante la ecuación 7.

$$\%Grasa = \left[\frac{M_f}{M_i} \right] \times 100\% \quad (7)$$

Donde:

Mf: Peso de la fracción lipídica recuperada [g]

Mi: Peso inicial de la muestra [g]

3.1.5. Contenido de celulosa

El contenido de celulosa de la muestra se lo determinó mediante el método de Dominguez. Se pesaron 1g de la muestra seca. Se la colocó en un balón de 250ml, se agregaron 15ml de ácido acético al 80% y 1.5ml de ácido nítrico al 68%; se colocó el balón en un reflujo durante 20 minutos. Posteriormente, se filtró la solución con agua hirviendo y con pequeñas cantidades de etanol. Se colocó la muestra filtrada en crisoles y se la secó en la estufa a 105°C durante 24 horas, se dejó enfriar y se pesó. Finalmente, se incineró la muestra a 540°C durante 4 horas, se dejó enfriar y se pesó (25). Se determinó el contenido de celulosa mediante la ecuación 8.

$$\%Celulosa = \left[\frac{M_f - M_c}{M_i} \right] \times 100\% \quad (8)$$

Donde:

Mf: Peso de la muestra secada [g]

Mc: Peso de la muestra calcinada [g]

Mi: Peso inicial de la muestra [g]

3.1.6. Contenido de lignina

El contenido de lignina de la muestra se lo determinó a mediante el método de la AOAC 973.18 (33). El método consistió en pesar 1g de la muestra seca y colocarla en un vaso de precipitación. Se añadieron 15ml de una solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 72% y se lo agitó durante 2 horas. Se transfirió la sustancia a un balón de 250ml, se agregaron 125ml de agua destilada, y se colocó la mezcla en reflujo durante 4 horas. Finalmente, se filtró y se lavó el residuo con agua caliente, se lo secó en la estufa a 105°C durante 3 horas y se pesó (33). Se determinó el contenido de lignina mediante la ecuación 9.

$$\%Lignina = \left[\frac{M_f}{M_i} \right] \times 100\% \quad (9)$$

Donde:

Mf: Peso de la muestra secada [g]

Mi: Peso inicial de la muestra [g]

3.2. Pretratamientos

Se realizó los pretratamientos de la cáscara de cacao en un reflujo con intervalos de tiempo de 1h, 4h y 6h (ver anexo 6.1). En cada uno de los reflujos se mantuvo una relación sólido-líquido de 1/15, es decir 1g de la biomasa a tratar por cada 15ml de la solución. La muestra después del pretratamiento es filtrada y secada a 100°C durante 24h la parte sólida.

3.2.1. Pretratamiento con ácido sulfúrico (H₂SO₄)

Se preparó una solución de ácido sulfúrico al 2% v/v y se colocaron la muestra con la solución en un balón de reflujo. Luego del pretratamiento se filtró la muestra y se lavó con abundante agua, hasta que el agua del filtrado no contenga un pH ácido, para un posterior secado de la parte sólida (5).

3.2.2. Pretratamiento con hidróxido de sodio (NaOH)

Se preparó una solución de hidróxido de sodio al 2% p/v y se la colocaron la muestra con la solución en un balón de reflujo. Luego del pretratamiento se filtró la muestra y se lavó con abundante agua, hasta que el agua del filtrado no contenga un pH básico, para un posterior secado de la parte sólida (41).

3.2.3. Pretratamiento con hidróxido de amonio (NH₄OH)

Se preparó una solución de hidróxido de amonio al 15% v/v y se la colocaron la muestra con la solución en un balón de reflujo. Luego del pretratamiento se filtró la muestra y se lavó con abundante agua, se recomienda primero filtrar con papel filtro de café, ya que la parte líquida es bastante viscosa. Posteriormente se lavó la muestra usando papel filtro de laboratorio, para luego ser secada de la parte sólida (5).

3.2.4. Pretratamiento con agua (H₂O)

Se realizó un pretratamiento con agua para tener un punto de partida implementando una digestión sencilla, la cantidad de agua para este pretratamiento va a ser igual a la relación sólido-líquido que se implementó en los otros pretratamientos. Luego del pretratamiento se lavó la muestra pretratada y se la secó.

3.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido es un instrumentos que permite la observación y caracterización superficial de sólidos orgánicos e inorgánicos mediante un haz de electrones, logrando tener una gran profundidad de campo, obteniendo un enfoque de una gran parte de la muestra estudiada (42).

Se realizó este análisis de la estructura de la biomasa de la cáscara de la mazorca del cacao en un equipo SEM-JEOL con modelo LT300, se observó la biomasa sin pretratar y se comparó con cada uno de los pretratamientos realizados. Para ello, se observó la estructura interna a presiones entre 30Pa-50Pa con un voltaje de 5kV a una resolución de 500x y 1000x.

3.4. Hidrólisis enzimática

Para realizar la hidrólisis enzimática se procedió a colocar en un frasco 50ml de una solución buffer de citrato de sodio a 50mM y a un pH de 4,8. Luego se selló el frasco con un corcho, el cual contenía dos jeringas incrustadas, y se lo esterilizó mediante autoclave. Una vez esterilizado se introdujeron 7g de biomasa seca por cada 50ml de solución buffer, se añadió la enzima celulasa, manteniendo una relación de 20 FPU por gramos de biomasa seca, esto se lo realizó en un medio estéril. Luego, se realizó un flashing con nitrógeno por 2 minutos, para así crear un medio anaerobio, es decir sin presencia de oxígeno (ver anexo 6.2). Finalmente se colocó el frasco con el medio en una incubadora a 55°C durante 72 horas (30).

3.5. Estimación de azúcares

Se determinó la cantidad de azúcares reductores presentes en la solución líquida después de cada pretratamiento y después de cada hidrólisis. Para ello se usó un refractómetro, el cual se basa en la refracción de la luz, cuya unidad de medida son los grados Brix (°Bx) (43). Los grados Brix se utilizan para determinar el cociente total de sacarosa disuelta en un líquido, obteniendo así la concentración de azúcares reductores en una disolución; por ejemplo, 25°Bx contiene 25%g de azúcar (sacarosa) por 100g de líquido (44). Para determinar los grados Brix se colocó una gota de la disolución en el refractómetro y se leyó el valor que este nos muestra.

3.6. Fermentación

Para realizar la fermentación se colocó en un Erlenmeyer la parte líquida que se obtuvo de la hidrólisis enzimática después de su filtración. Se activó la levadura Safbrew

F-2 que es la levadura *saccharomyces cerevisaie*, usando un eppendorf, en el cual se colocaron 2g de levadura en 10ml de agua, se agregó 1g de azúcar y se lo sometió a baño maría a una temperatura de 37°C, se dejó reposar entre 10-15 min. Posteriormente, se agregó la levadura en una relación de 4% del volumen en el Erlenmeyer previamente preparado. Se creó una trampa por medio de una manguera que sale del Erlenmeyer hacia un frasco con una solución de hidróxido de sodio al 2%, para así atrapar el CO₂ producido durante la fermentación. Se colocó el medio en una incubadora por un periodo mínimo de 24h a una temperatura de 37°C (ver anexo 6.3).

3.7. Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

La técnica GC-MS es una clase de análisis donde se combina la cromatografía de gases (GC) y la espectrometría de masas (MS). La primera es una técnica que permite separar mezclas muy complejas, en donde cada soluto de la muestra tiene una diferente afinidad hacia la fase estacionaria, permitiendo así su separación, pero sin identificar qué tipo de soluto es; por otra parte, la espectrometría de masas permite identificar de forma inequívoca el soluto que se separó en la cromatografía, mediante un espectro característico de cada molécula (45).

La identificación de etanol generado luego de la fermentación se realizó empleando el equipo GCMS-QP2010 equipado con un puerto de inyección split (1:100). Se utilizó una columna capilar Mxt-1 de 10 m, D.I: 0,18mm y df: 0,20µm. La temperatura inicial se programó a 40°C hasta una temperatura final de 80°C, con una tasa de 2,50°C/min con un tiempo de espera de 3min. Se utilizó gas helio como gas de arrastre. Se realizó una curva de calibración de etanol con concentraciones conocidas en un rango de [0,0625-1]%v/v. Se graficó el área del pico generado por el etanol vs. la concentración conocida del mismo. En base a la curva obtenida se analizó cada una de las muestras de la fermentación y se determinó la concentración de etanol presente en cada una.

3.8. Análisis estadístico

Los resultados se reportan como el promedio de tres réplicas con su desviación estándar. Un análisis de varianza (ANOVA) se aplicó, y las comparaciones múltiples de pares se llevaron a cabo con el método de Tukey, con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$). Para esto, se utilizó el software Minitab.

4. Resultados y discusión

4.1. Caracterización inicial

Se realizó una caracterización previa de la mazorca de cacao, determinando los principales componentes que esta biomasa posee. Se determinaron la cantidad de celulosa, lignina, cenizas, nitrógeno, proteína, grasa y humedad. Las variables más relevantes para el presente estudio fueron la cantidad de celulosa y lignina, ya que los cambios de estos dos componentes van a ser monitoreados después de cada pretratamiento. Cabe recalcar que esta caracterización se realizó en base seca, luego de moler la mazorca de cacao y trabajar con muestras de 1-2mm de mesh. En la tabla 4.1 se tiene los datos obtenidos de la caracterización del cacao.

Tabla 4.1: Caracterización mazorca del cacao

Parámetro	Caracterización	
	Promedio [%]	Desviación Estándar [%]
Celulosa	25,34*	3,05
Lignina	46,61*	2,89
Cenizas	8,45*	0,84
Nitrógeno	0,66*	0,01
Proteína	4,12*	0,04
Grasa	0,17*	0,11
Humedad	91,55	0,84

*base seca

La lignina es importante, ya que es un compuesto que recubre a la celulosa y da la rigidez a la fibra de la mazorca. La celulosa es el polisacárido de interés que va a ser utilizado en los procesos de fermentación (22), es por esta razón que se requiere conocer cuánto de lignina y celulosa se tiene inicialmente, ya que los pretratamiento ácidos y básico tienen como objetivo degradar y eliminar la lignina para así poder liberar y tener mayor accesos a la celulosa presente en la biomasa, aumentando así el rendimiento en la producción de etanol durante la fermentación. En este caso, se puede observar que la cantidad inicial de lignina es alta, la cual corresponde a un $(46,61 \pm 2,89)$ %, mientras que la cantidad de celulosa que se tiene fue de $(25,34 \pm 3,05)$ %, por lo que se tiene una alta concentración de lignina en la cáscara de la mazorca del cacao, justificando así un pretratamiento para que esta sea degradada y eliminada.

Algunos de los resultados se pueden comparar con datos obtenidos por otros autores. Sin embargo, no se ha realizado una completa caracterización de toda la mazorca, ya que la mayoría de los estudios se han concentrado en el mesocarpio. Autores

como Omar Tuchan (2014) ha determinado la cantidad de diferentes componentes de la mazorca, entre estos se tiene que la cantidad de ceniza fue de 8,92%, la de grasa fue de 2,40%, la de proteína fue 4,52% y humedad fue de 86,5% (46); por lo que los resultados obtenidos de la caracterización mostrados en la tabla 4.1 son bastante parecidos a los obtenidos por otros autores, demostrando que los protocolos implementados y los resultados obtenidos son apropiados.

4.2. Pretratamientos a la mazorca de cacao

4.2.1. Pretratamiento con ácido sulfúrico (H_2SO_4)

El pretratamiento con ácido sulfúrico se lo realizó a una concentración de 2% v/v en reflujo, en base a lo reportado en estudios previos con otros tipos de biomasa lignocelulósica (47). El pretratamiento se lo realizó a tres diferentes tiempos y se procedió a caracterizar nuevamente la biomasa pretratada para determinar el cambio en la concentración de celulosa y lignina presente en ella. Se obtuvo que la menor concentración de lignina y la mayor concentración de celulosa fue a las 4h, con unos valores de $(36,27 \pm 3,54)\%$ y $(46,89 \pm 1,88)\%$, respectivamente.

En la figura 4,1 se puede observar la variación de la cantidad de celulosa y lignina, comparando con la cantidad inicial presente en la biomasa antes de ser pretratada.

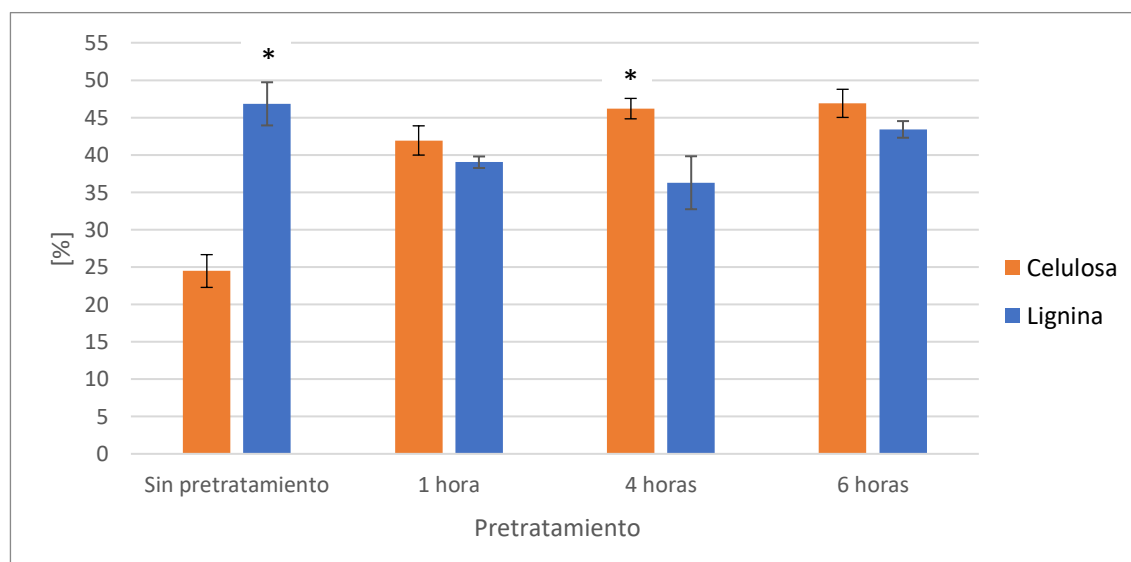


Ilustración 1 Figura 4.1: Concentración de celulosa y lignina después de pretratamiento con 2% v/v H_2SO_4 , a diferentes tiempos.

(*) Representa el componente con mayor porcentaje entre lignina y celulosa para un pretratamiento dado ($p < 0,05$)

Se puede observar que el mejor tiempo de pretratamiento con ácido sulfúrico fue de 4 horas, debido a que se obtiene un aumento máximo del 20,85% en la concentración de celulosa. Al realizar un análisis estadístico, se pudo comprobar que los pretratamientos de 1h y 6h no tienen una diferencia estadística significativa entre la concentración de lignina y celulosa, pero el pretratamiento de 4h sí presenta esta diferencia, comprobando así que el tiempo de reflujo de este pretratamiento fue el mejor. Esto concuerda con un estudio realizado a la biomasa de la hierba de elefante (*Pennisetum* sp), la cual se la pretrató con ácido sulfúrico al 2%v/v de concentración, lo que provocó un aumento del 22,74% en la concentración de celulosa y una disminución del 11,33% en la concentración de lignina (5). La lignina en un pretratamiento ácido se solubiliza rápidamente alterando su estructura, provocando así una liberación de la celulosa y hemicelulosa (2); por esta razón se puede evidenciar un aumento en la concentración de celulosa y una disminución en la lignina.

4.2.2. Pretratamiento con hidróxido de sodio (NaOH)

El pretratamiento con hidróxido de sodio se lo realizó a una concentración de 2% p/v en un reflujo, en base a lo reportado en estudios previos con otros tipos de biomasa lignocelulósica (48). El pretratamiento se lo realizó a tres diferentes tiempos y se caracterizó cada una de las biomásas tratadas en cada tiempo. Se obtuvo que la menor concentración de lignina fue a las 4h de pretratamiento, con un valor de $(24,43 \pm 4,01)\%$, y la mayor concentración de celulosa fue a las 6h, con un valor de $(60,56 \pm 2,36)\%$.

En la figura 4,2 se puede observar la variación de la cantidad de celulosa y lignina, comparando con la cantidad inicial presente en la biomasa antes de ser pretratada.

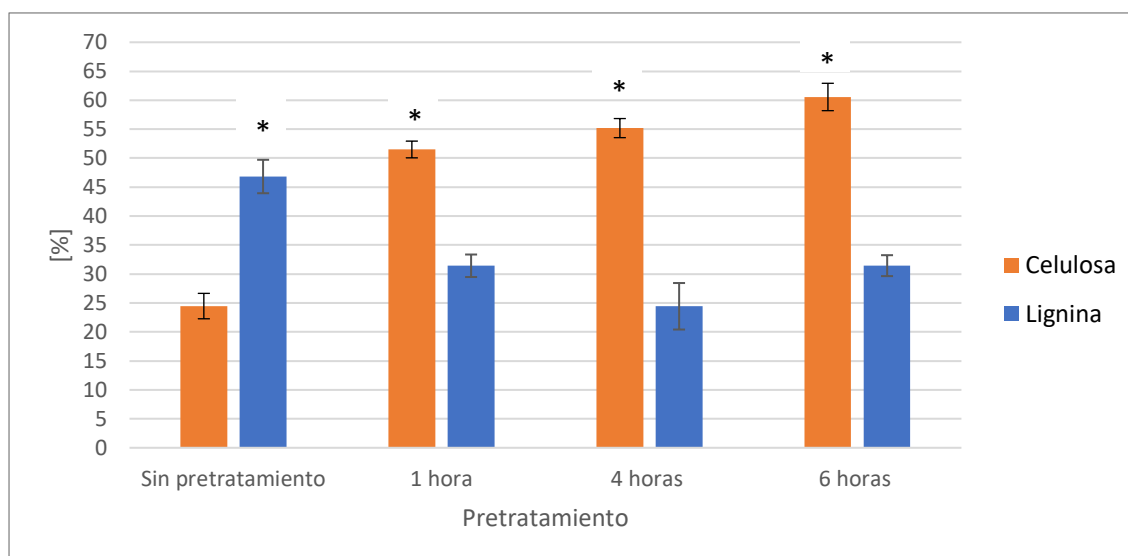


Figura 4.2: Concentración de celulosa y lignina después de pretratamiento con 2% p/v NaOH, a diferentes tiempos

(*) Representa el componente con mayor porcentaje entre lignina y celulosa para un pretratamiento dado ($p < 0,05$)

Al realizar el análisis estadístico de los datos de este pretratamiento, se obtuvo que todos los tiempos de reflujo tienen una diferencia estadística significativa entre la cantidad de lignina y la de celulosa. Se tuvo que el mejor tiempo de pretratamiento con hidróxido de sodio fue de 4 horas, debido a que se logró un aumento del 30,7% en la concentración de celulosa; aunque la concentración de celulosa a la 6h es mucho mayor, se ve compensado ya que a las 4h de reflujo se obtuvo la máxima disminución de lignina en un 22,4%. Estos resultados se pueden relacionar con pretratamientos con hidróxido de sodio utilizado en otras biomásas, como es el caso de la biomasa King Grass (*Pennisetum hybridum*), la cual se la pretrató con esta base al 2%p/v con una relación 1/15 sólido-líquido, obteniendo así un aumento del 58% en la concentración de celulosa y una disminución del 37,6% en la concentración de lignina (18). Esta variación de celulosa y lignina se produce debido a que, esta base genera una hinchamiento, que reduce la cristalinidad interna, provocando así una ruptura en la estructura de la lignina y una liberación de la celulosa contenida en ella (22).

4.2.3. Pretratamiento con hidróxido de amonio (NH_4OH)

El pretratamiento con hidróxido de amonio se lo realizó a una concentración de 15%v/v en un reflujo, en base a lo reportado en estudios previos con otros tipos de biomasa lignocelulósica que utilizan el método AFEX, que tiene como reactivo este compuesto (49). De la misma manera se realizó con 1h, 4h y 6h de reflujo. Luego de realizar la caracterización de celulosa y lignina después del pretratamiento, se obtuvo que

la menor concentración de lignina se alcanzó a las 4h de pretratamiento, con un valor de $(33,79 \pm 1,89)\%$, y la mayor concentración de celulosa fue a las 4h, con un valor de $(43,99 \pm 0,66)\%$.

En la figura 4,3 se puede observar la variación de la cantidad de celulosa y lignina, comparando con la cantidad inicial presente en la biomasa antes de ser pretratada.

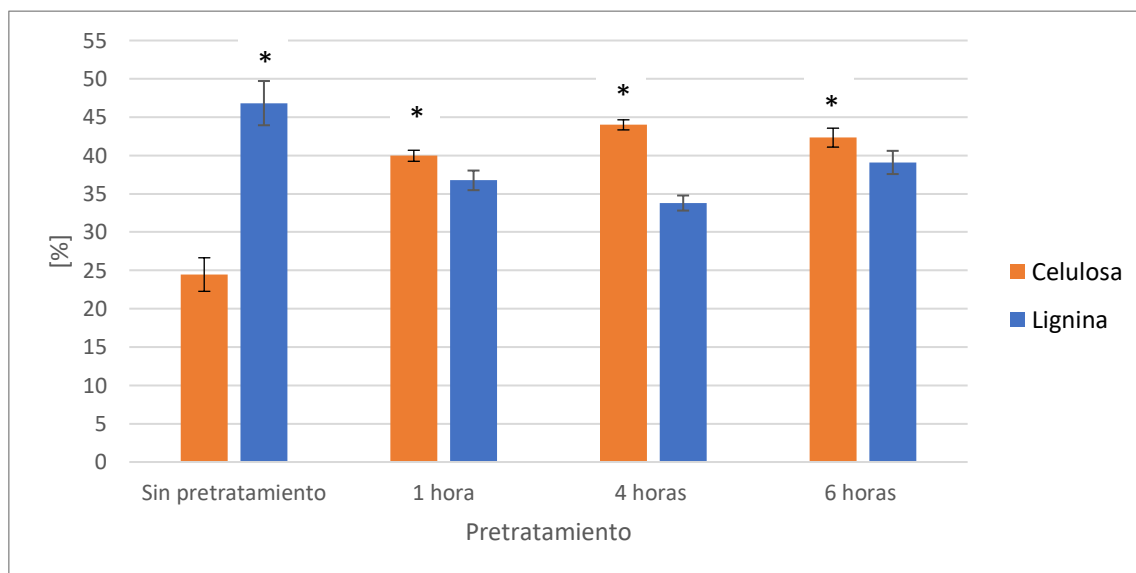


Figura 4.3: Concentración de celulosa y lignina después de pretratamiento con 15% v/v NH₄OH, a diferentes tiempos

(*) Representa el componente con mayor porcentaje entre lignina y celulosa para un pretratamiento dado ($p < 0,05$)

Al igual que el pretratamiento con hidróxido de sodio, el análisis estadístico demostró que la concentración de lignina y celulosa en cada tiempo de reflujo tiene una diferencia estadísticamente significativa, es decir que el aumento de celulosa es mucho más grande que la disminución de la lignina. Como se observa en la figura, el mejor tiempo de pretratamiento con hidróxido de amonio fue de 4 horas, debido a que se obtuvo un aumento máximo del 19,5% en la concentración de celulosa, y una máxima disminución de lignina en un valor de 13,4%. Esto concuerda con un estudio realizado a la biomasa de *Pennisetum sp*, la cual se la pretrato con amoniaco, lo que provocó un aumento del 13,14% en la concentración de celulosa (5). Por otra parte en una estudio en donde se realizó el pretratamiento AFEX a residuos de maíz se determinó una disminución de lignina de 18,50% a 8,80% (5).

4.2.4. Pretratamiento con H₂O

Se realizó un pretratamiento con agua para tener un punto de partida en el que se analizó la variación de celulosa y lignina mediante una degradación con agua sin el uso

de ningún químico. Para ello, lo único que se consideró fue la relación sólido-líquido de 1/15, se mantuvo los mismos tiempos de reflujo que en los anteriores pretratamientos. Se obtuvo que la menor concentración de lignina fue a la 1h de pretratamiento, con un valor de $(37,74 \pm 1,41)\%$, la misma que es cercana a lo obtenido en el tiempo de reflujo de 4h, el cual fue $(37,97 \pm 1,89)\%$. La mayor concentración de celulosa fue a las 4h, con un valor de $(42,47 \pm 2,45)\%$.

En la figura 4,4 se puede observar la variación de la cantidad de celulosa y lignina, comparando con la cantidad inicial presente en la biomasa antes de ser pretratada.

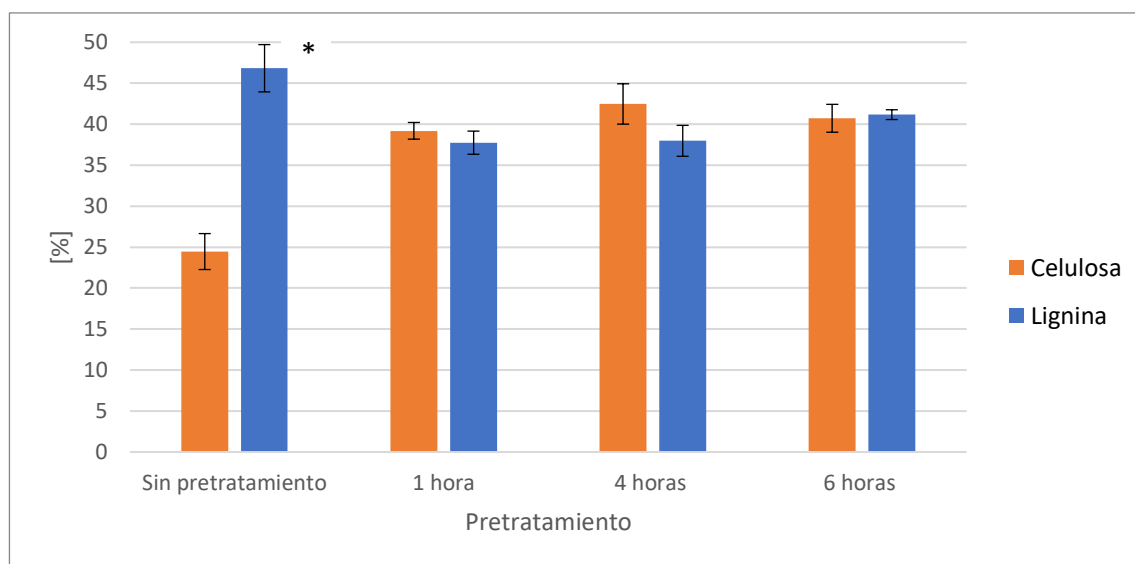


Figura 4.4: Concentración de celulosa y lignina después de pretratamiento con H₂O, a diferentes tiempos

(*) Representa el componente con mayor porcentaje entre lignina y celulosa para un pretratamiento dado ($p < 0,05$)

El análisis estadístico mostró que ningún tiempo de reflujo tiene una diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de lignina y celulosa comparando los tres intervalos, por lo que ningún pretratamiento muestra aumento de la concentración de celulosa ni una disminución en la concentración de lignina, en el que se pueda decir que hay una variación significativa, por lo que los tres pretratamientos generan los mismos cambios entre ellos y solo presentan una diferencia en comparación a las concentraciones iniciales de celulosa y lignina. Para el pretratamiento a 4h se tuvo un aumento de celulosa del 18,01% y una disminución de lignina del 8,85%; estos valores concuerdan con un estudio realizado a la moringa Oleífera en el cual se aplicó un pretratamiento con agua caliente, y se obtuvo un aumento de celulosa del 28% al 46% y una disminución de lignina del 13,2% al 6,5% (20).

En base a todos los resultados anteriores se realizaron las figuras 4.5 y 4.6, en las que se observa la variación de celulosa y lignina, respectivamente, en cada pretratamiento y a su vez en cada intervalo de tiempo.

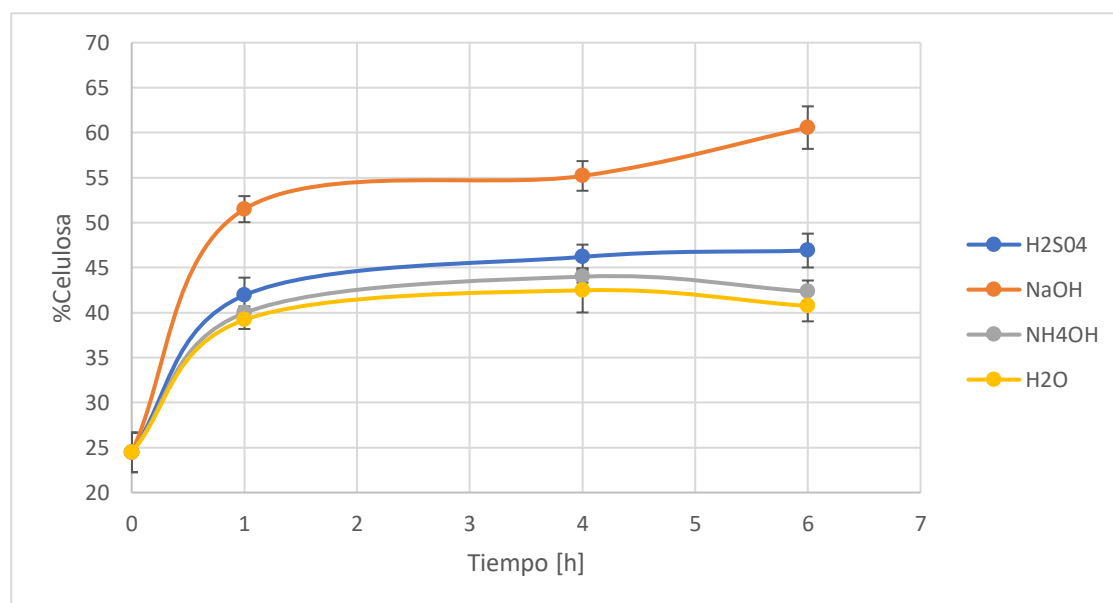


Figura 4.5: Variación en la concentración de celulosa en el tiempo para diferentes pretratamientos de la biomasa lignocelulósica de la cáscara de la mazorca de cacao CCN51

En la figura 4.5 se puede observar que el pretratamiento con hidróxido de sodio tiene el mayor aumento en la concentración de celulosa durante los tres intervalos de tiempo. El análisis estadístico demostró que el pretratamiento con hidróxido de sodio tuvo una diferencia estadística significativa ($p < 0,05$), con un aumento máximo en la concentración de celulosa en cada uno de los tiempos de reflujos, con un valor de $(43,99 \pm 0,66)$ % a las 4h, comparado con los demás pretratamientos; cabe indicar que no existe diferencia estadística entre el pretratamiento de 1h y 4h, pero sí hay un aumento significativo a las 6h. Para el hidróxido de amonio, se tuvo un aumento estadístico significativo en la concentración de celulosa, pero a partir de las 4h de pretratamiento, esta concentración permanece constante. Por otra parte, para el pretratamiento con ácido sulfúrico, hay una variación significativa entre los tiempos de 1h y 6h, mientras que para el tiempo de 4h tuvo un valor aproximado al de 6h. Finalmente para el pretratamiento con agua, ningún tiempo de reflujos presenta una diferencia estadísticamente significativa en el aumento de la concentración de celulosa, pero sí comparado con la concentración inicial de celulosa.

En base a los resultados obtenidos del aumento de celulosa para cada pretratamiento se observa que el tiempo de reflujo más óptimo para los pretratamientos fue de 4 horas, ya que cada pretratamiento presenta su máximo de celulosa en ese punto.

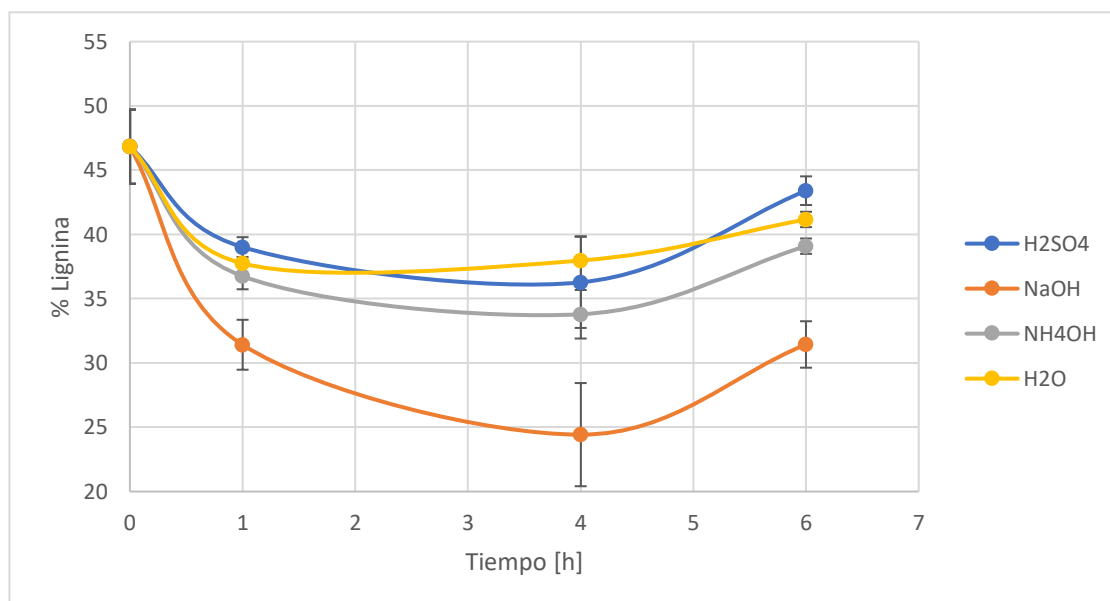


Figura 4.6: Variación en la concentración de lignina en el tiempo para diferentes pretratamientos de la biomasa lignocelulósica de la cáscara de la mazorca de cacao CCN51

En la figura 4.6 se puede observar la variación de la concentración de lignina para cada uno de los pretratamientos a diferentes tiempos de reflujos. El pretratamiento con hidróxido de sodio es aquel que tiene la mayor degradación de lignina, llegando a tener un mínimo de lignina ($24,43 \pm 4,01$)% a las 4 horas de reflujo; este pretratamiento tiene una diferencia estadística a las 4h de reflujo ($p < 0,05$), mientras que a la 1h y 6h de reflujo no hay diferencia. El hidróxido de amonio no tuvo diferencia estadística en los tiempos de 1h y 4h con el pretratamiento ácido y agua, pero si presenta diferencia a las 6h; este a su vez tuvo una diferencia estadística significativa en la disminución de lignina a las 4h, mientras que a la 1h y 6h fueron iguales. El pretratamiento con ácido sulfúrico y agua no presentaron una diferencia estadística en la variación de la concentración de celulosa; pero el ácido sulfúrico sí presentó una diferencia en su pretratamiento de 4h de reflujo comparado con el de 1h y 6h; por otra parte, el pretratamiento con agua no tuvo diferencia estadísticamente significativa entre sus tres tiempos de reflujo, solo la tuvo en comparación a la concentración inicial de lignina. Concluyendo que, para todos los tiempos de reflujo, el pretratamiento con hidróxido de sodio degradó la mayor cantidad de lignina.

Se puede observar también que después de las 4h de reflujo, la concentración de lignina empieza a aumentar, esto se puede deber a que, a partir de este tiempo de reflujo, el pretratamiento empieza a degradar otros componentes presentes en la biomasa, como la pectina, y al ser una determinación porcentual, hace que dicho porcentaje de lignina aumente en cada pretratamiento; por lo que, los pretratamientos a seis horas estarían degradando a la biomasa más de lo que se necesita.

Comparando con otros estudios con otras biomásas pretratadas con estos compuestos, se observó que el tiempo de pretratamiento cuando se usa una base como el hidróxido de sodio o el hidróxido de amonio varía entre 20min-60min, pero esto se debe a que el pretratamiento se lo realiza mediante el uso de un reactor cilíndrico de acero inoxidable, el cual tiene una operación Batch a altas temperaturas (48). Por ejemplo en un pretratamiento básico como hidróxido de amonio durante 20min a 170°C a los residuos de maíz se tuvo un aumento en un 26,3% en la concentración de celulosa y una disminución en un 9,7% en la concentración de lignina (50). Con estos resultados se puede concluir que, al realizar un pretratamiento básico a la cáscara de la mazorca de cacao, durante 4h de reflujo se logra alcanzar el aumento y disminución porcentual en la concentración de lignina y celulosa que se alcanzan en otras biomásas que son sometidas a un pretratamiento especial a altas temperaturas.

De la misma manera se analizó el pretratamiento con ácido sulfúrico de otros estudios. En este pretratamiento se utiliza generalmente un reactor Parr que logre alcanzar temperaturas elevadas entre 130°C a 200°C y un tiempo de pretratado entre 30min-120min (48). En un estudio realizado a la biomasa de pasto maralfalfa, se realizó un pretratamiento con ácido sulfúrico 2%v/v a una temperatura de 190°C, donde la celulosa aumento de un 33,79% a 56,53% y la lignina se redujo de un 36,30% a 16,04% (5). Al realizar un pretratamiento ácido durante 4h de reflujo a la cáscara de la mazorca de cacao se logra alcanzar rendimientos cercanos en el aumento de celulosa y disminución de lignina que los que se alcanza a altas temperaturas.

El rendimiento se calculó en base a cuanta biomasa queda luego del pretratamiento. En la figura 4.7 se puede observar que el rendimiento obtenido al aplicar un pretratamiento con ácido sulfúrico a las 4h fue de $(48,27 \pm 1,49)\%$, el cual es uniforme a lo largo del proceso. Por otra parte, cuando se utiliza el hidróxido de sodio para realizar el pretratamiento en un tiempo de 4h, se observa que el rendimiento es bajo, ya que, al ser

una base fuerte, la biomasa va a sufrir una alta degradación en su estructura, en especial la lignina que brinda rigidez a esta, siendo el caso que a las 4 horas se tiene un rendimiento de $(37,72 \pm 1,56)\%$ y a las 6 horas el rendimiento baja aún más, a un valor de $(33,02 \pm 1,50)\%$. El rendimiento que se obtuvo cuando se utiliza hidróxido de amonio a las 4 horas fue bastante parecido al del ácido sulfúrico, pero mucho mayor que el hidróxido de sodio, en este caso, se obtuvo un rendimiento del $(48,55 \pm 0,67)\%$. Finalmente, para el pretratamiento con agua se tuvo un rendimiento alto en comparación a los demás pretratamientos, obteniendo a las 4h un rendimiento de $(50,15 \pm 0,23)\%$; el cual corresponde al mayor valor entre los cuatro pretratamientos.

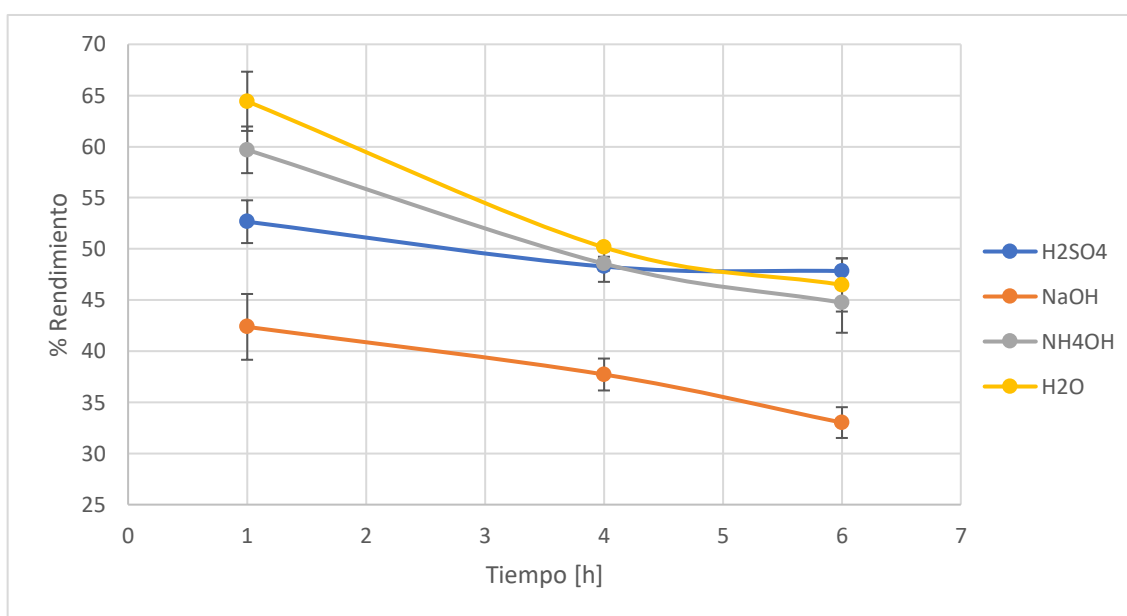


Figura 4.7: Rendimiento de los pretratamientos aplicados a la biomasa lignocelulósica de la cáscara de la mazorca de cacao CCN51, a diferentes tiempos

En base a los resultados anteriores, la biomasa pretratada que va a ser utilizada para la hidrólisis enzimática y una posterior fermentación fue la que se le sometió a un tiempo de reflujo de 4 horas para cada pretratamiento. Esta selección también es fundamentada debido al rendimiento de cada uno de los pretratamientos planteados anteriormente. En la figura 4.7 se puede apreciar los rendimientos de cada pretratamiento a los diferentes tiempos de reflujo. A las cuatro horas los rendimientos son parecidos, con excepción del pretratamiento con hidróxido de sodio, el cual es mucho más bajo que los otros, pero este a su vez es compensado por el gran aumento que este produce en la concentración de celulosa y por la disminución de la concentración de la lignina, analizados anteriormente.

En base al análisis estadístico se determinó que tanto el rendimiento del pretratamiento de ácido sulfúrico como el de hidróxido de sodio no tienen ninguna diferencia estadística ($p < 0,05$) en sus tres tiempos de reflujo; por otra parte, el hidróxido de amonio y agua presentan dicha diferencia en los tiempos de 1h y 4h, pero el de 6h es parecido estadísticamente al rendimiento de 4h en cada uno de ellos.

4.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se realizó una microscopía electrónica de barrido para observar la morfología de la biomasa sin pretratamiento, y cómo esta biomasa va cambiando su estructura cuando es sometida a los diferentes pretratamientos descritos.

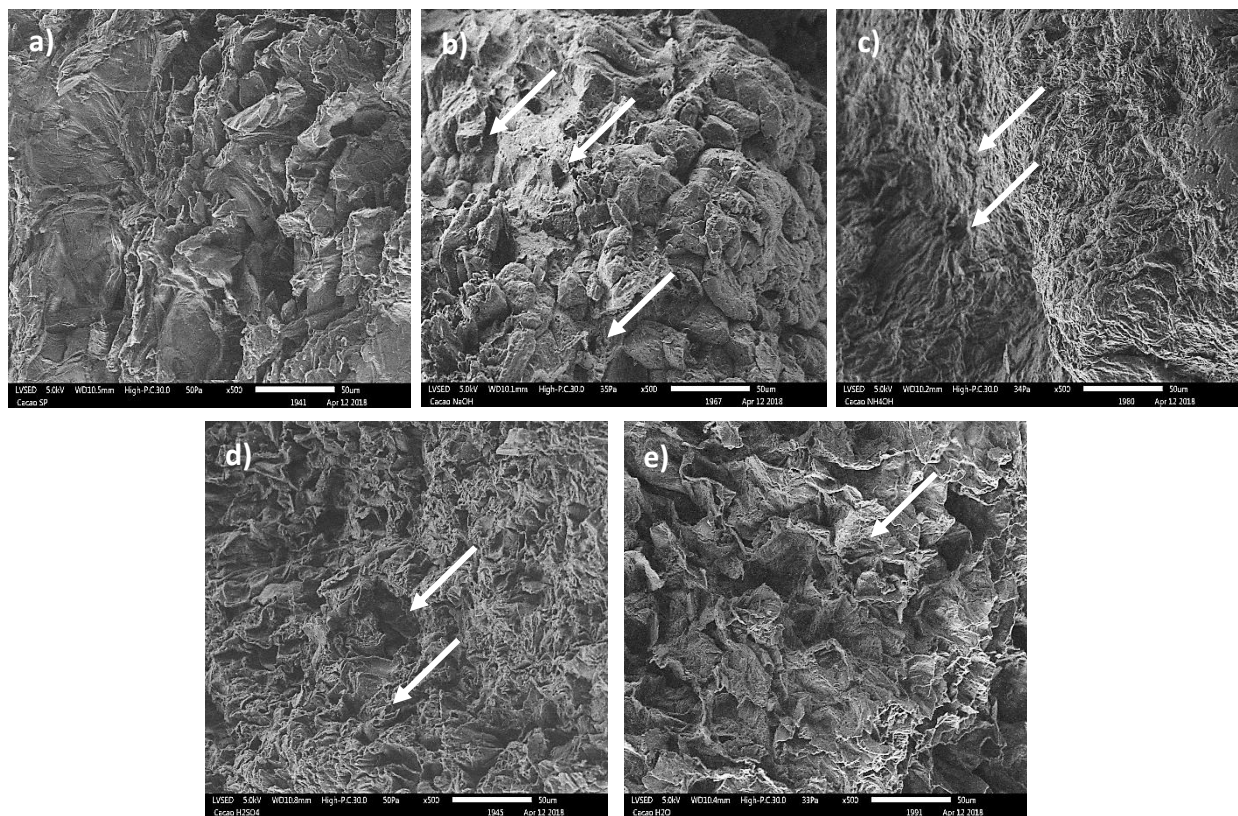


Figura 4.8: Microscopía electrónica de barrido a la biomasa de la mazorca de cacao a diferentes pretratamientos con un aumento de 500x. a) Sin pretratar, b)NaOH, c)NH4OH, d)H2SO4, e)H2O

(Las flechas representan la degradación que la biomasa presenta por acción de un pretratamiento dado)

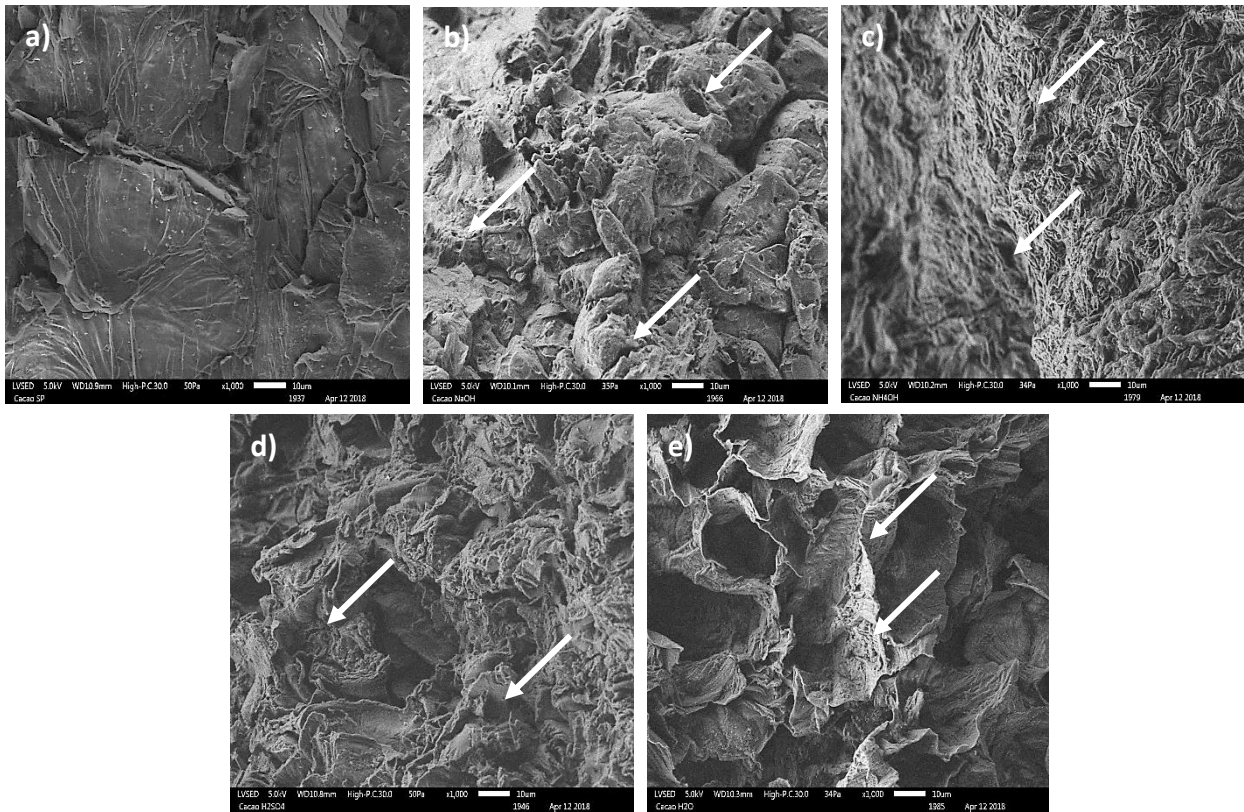


Figura 4.9: Microscopía electrónica de barrido a la biomasa de la mazorca de cacao a diferentes pretratamientos con un aumento de 1000x. a)Sin pretratar, b)NaOH, c)NH4OH, d)H2SO4, e)H2O

(Las flechas representan la degradación que la biomasa presenta por acción de un pretratamiento dado)

Como se puede observar en la figura 4.8, la muestra sin pretratar tiene una estructura compacta con poca cantidad de poros, formando una capa laminar, la cual puede estar formada principalmente por lignina, que le da la rigidez a las fibras y protege la estructura interna de la mazorca del cacao. Tanto en el pretratamiento con hidróxido de sodio como en el del hidróxido de amonio se puede observar una degradación superficial en la estructura, aumentando los valles y las grietas en la superficie (flechas), teniendo así regiones de baja cristalinidad para el mayor acceso de las enzimas a los azúcares en el proceso de hidrólisis. Esto concuerda con la máxima disminución de lignina que estos dos pretratamientos presentaron. Por otra parte, el ácido sulfúrico presenta una degradación más leve que la base, pero de la misma manera, se observa cómo el ácido ha degradado a esta biomasa. Finalmente, el pretratamiento con agua generó la menor degradación en la biomasa, ya que se puede observar la presencia de pocas grietas y poros. En la figura 4.9 se puede observar con una mejor resolución cómo la estructura interna de esta biomasa ha cambiado, comparando la muestra sin pretratar con las

pretratadas. Se puede apreciar que las láminas compactas que inicialmente tenía la biomasa se han alterado, ya que no presentan el mismo orden. La biomasa pretratada con las bases presenta una mayor cantidad de poros y grietas, comparado con los otros pretratamientos.

En base a este análisis se puede observar que los pretratamientos cumplen con su objetivo de alterar y degradar la estructura de la mazorca de cacao, destruyendo a la lignina y así liberando los compuestos internos como la celulosa y hemicelulosa. De la misma manera se puede decir que la biomasa que mayor degradación presenta es la pretratada con hidróxido de sodio. Estas imágenes concuerdan con otros estudios donde se observa la degradación mediante el uso de SEM. En un estudio realizado al material lignocelulósico de *Moringa Oleífera* donde se aplicó tres pretratamientos de ácido sulfúrico, hidróxido de sodio y agua caliente, se realizó un análisis SEM con una resolución 500x y 1000x de la biomasa pretratada y se observó que el pretratamiento que causó más daño fue el alcalino ya que presentó un grado de destrucción alto comparada con el del ácido y el agua, donde se presenta un menor daño, menor cantidad de grietas y arrugas (20). En otro estudio donde se aplicó un pretratamiento al pasto gigante con ácido sulfúrico y hidróxido de amonio, se realizó SEM y se observó que el pretratamiento básico generó huecos, grietas y deterioro de fibras que corresponde a regiones de baja cristalinidad de mayor accesibilidad a las enzimas en el proceso de hidrólisis. En el pretratamiento ácido se tuvo un mayor desorden de las fibras, con generación de grietas que indican la destrucción de la matriz lignina-celulosa (3).

Estos cambios físicos en la biomasa de la cáscara de cacao se pueden relacionar con los cambios en la concentración de lignina y celulosa. Debido a la degradación que se observa en la biomasa, con sus grietas y poros, se puede relacionar con la liberación que hubo de celulosa, la cual aumentó la concentración de la misma, esto también se debe a que se tuvo un rompimiento estructural de las fibras, las cuales están directamente relacionadas con la lignina, razón por la cual, su concentración después de los pretratamientos es más baja. En base a la figura 4.9 se observó que la mayor degradación se dio con el pretratamiento con hidróxido de sodio, el cual fue el pretratamiento que generó la mayor concentración de celulosa y la menor concentración de lignina.

4.4. Azúcares después del pretratamiento

Después de cada pretratamiento se midió el valor de azúcar presente en la solución filtrada, esto se realizó por medición de grados Brix. En la figura 4.10 se muestra como la cantidad de azúcar varía para cada pretratamiento en los diferentes tiempos de reflujos, observando en cada curva dónde se tiene la máxima concentración de azúcar.

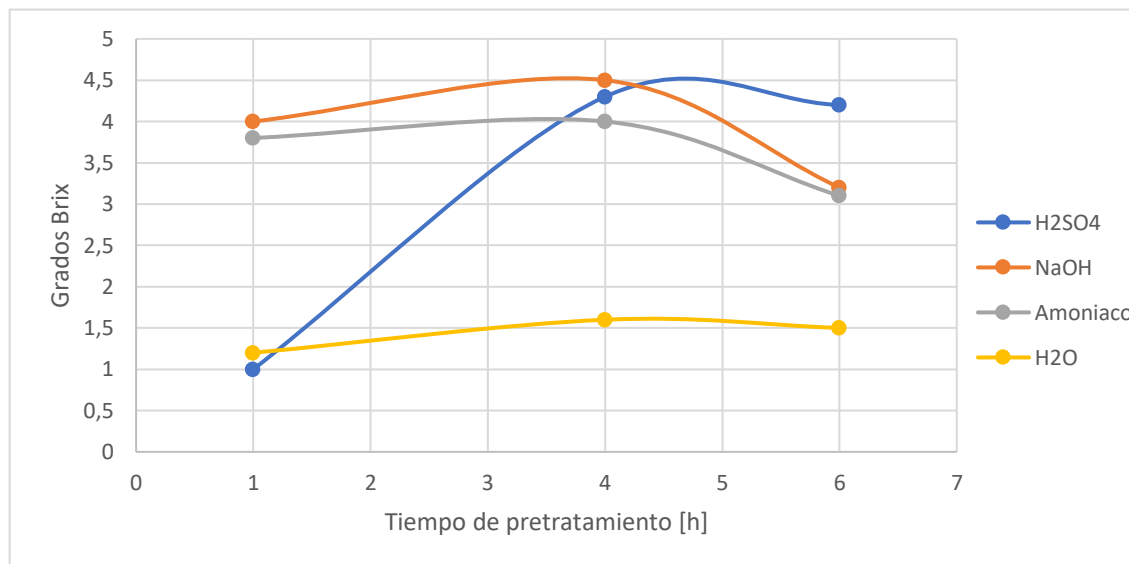


Figura 4.10: Grados Brix después de diferentes pretratamientos a la biomasa lignocelulósica de la mazorca de cacao CCN51, a diferentes tiempos de reflujos

Los grados Brix indican cuantos gramos de sacarosa hay por cada 100gr de disolución, es decir 1°Bx es igual a 1% de azúcar disuelto en 100 gramos de solución (51). Como se puede observar en la figura 4.10 el pretratamiento que más genera azúcar a partir de la biomasa de la mazorca de cacao es el pretratamiento con hidróxido de sodio, el cual tiene un máximo a las 4h de reflujo, generando 4,5% de azúcar disuelto por 100gr de la solución filtrada después del pretratamiento. Al igual que en el hidróxido de sodio, los demás pretratamientos también presentan un aumento de azúcar conforme aumenta el tiempo de reflujo. Todos los pretratamientos poseen un máximo en el tiempo de 4h, donde se puede observar claramente que la cantidad de azúcares generados por el pretratamiento con agua es bastante bajo, de la misma manera estos resultados concuerdan con lo previamente descrito, en que los pretratamientos a 4h de reflujo son los óptimos para realizar una hidrólisis enzimática y una posterior fermentación. En dicha gráfica también se puede observar que la concentración de azúcares se reduce después de las 4h, esto se puede deber a que el pretratamiento empieza a degradar más compuestos

de la biomasa, lo que puede provocar que empiece a reaccionar con los azúcares que se van generando, haciendo que la concentración vaya disminuyendo.

Después de cada pretratamiento se analizó una vez la concentración de azúcares, ya que lo que se buscaba era un monitoreo de los pretratamientos, por lo que no se puede hablar de una significancia estadística entre los pretratamientos y entre los tiempos de reflujo.

En este punto se puede comprobar que los pretratamientos producen un cambio en la estructura de esta biomasa, ya que, estos procesos tienen como objetivo alterar la estructura de la biomasa lignocelulósica para mejorar la accesibilidad de la celulosa a las enzimas que convierten los carbohidratos estructurales en monosacáridos fermentables, mediante la degradación parcial o total de la lignina (5); por lo que la presencia de azúcares luego del pretratamiento indica que existe liberación de la celulosa y hemicelulosa de las estructura de esta biomasa.

4.5. Azúcares generados en la hidrólisis enzimática

Luego de realizados los pretratamientos, los cuales degradaron la lignina de la biomasa y liberaron la celulosa de la misma, se procedió a realizar una hidrólisis enzimática mediante el uso de enzimas celulasas, las cuales van a descomponer a los polisacáridos como la celulosa y hemicelulosa, en azúcares más simples. Esta hidrólisis se realizó con la biomasa pretratada durante 4h en cada pretratamiento, ya que ésta contiene la mayor cantidad de celulosa y la menor cantidad de lignina. Los valores obtenidos se compararon con la cantidad de azúcar medida por grados Brix después de los pretratamientos a las 4h de reflujo, dichos resultados se pueden ver en la figura 4.11.

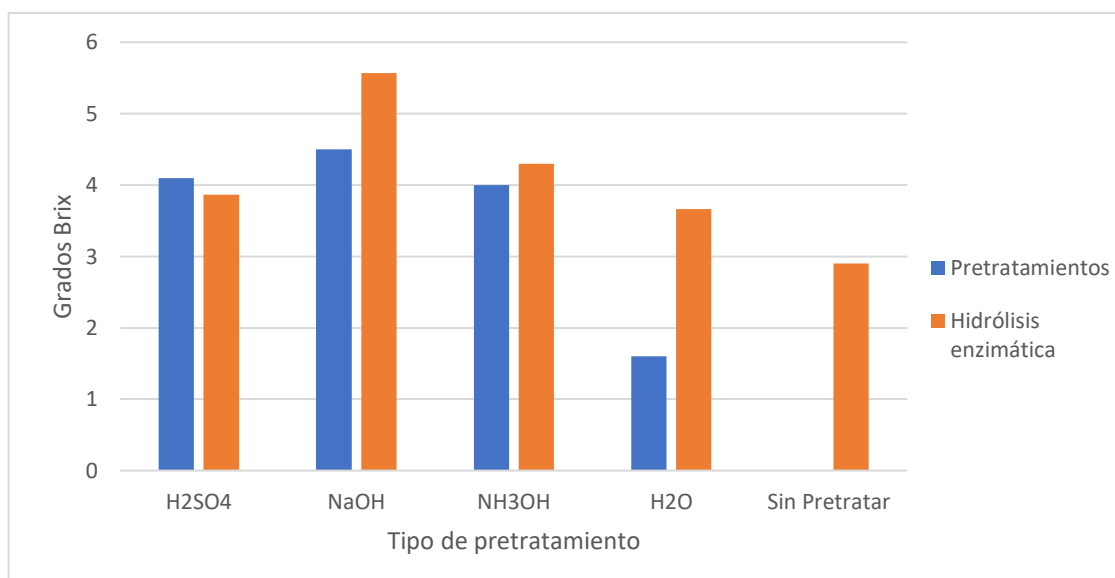


Figura 4.11: Comparación de la concentración de azúcares después de los pretratamientos a 4h de refluxo y después de la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica de la mazorca de cacao CCN51

Como se puede observar en la figura 4.11, la medición de grados Brix aumentó en cada pretratamiento. La mayor concentración de azúcares se registró con la biomasa pretratada con hidróxido de sodio, la cual tuvo un aumento de 4,5°Bx a 5,5°Bx; esto se debe a que esta biomasa obtenida de este pretratamiento tiene la mayor cantidad de celulosa disponible y la menor cantidad de lignina que impida el acceso a ésta, lo que permite que las enzimas celulasas degraden a la celulosa.

Otro aumento significativo que se observa en esta etapa es el de la biomasa pretratada con agua, la cual presenta un aumento de 1,6 °Bx a 3,7°Bx; pese a que este pretratamiento obtuvo la menor cantidad de celulosa liberada y una reducción de la lignina baja, permitió que las enzimas puedan interactuar con la celulosa presente y se lleve a cabo una descomposición monomérica; este aumento también puede deberse a que durante el pretratamiento no se liberaron todos los azúcares que están naturalmente en la biomasa, como es el caso de las pectinas, por lo que estas pudieron haberse liberado durante este proceso de hidrólisis, a medida de que las celulasas degradaban la matriz lignocelulósica; todos estas razones ayudaron a que concentración de azúcar aumente a un nivel parecido al que se obtuvo con la hidrólisis enzimática del pretratamiento con ácido sulfúrico, el cual fue de 3,8°Bx . Las celulasas son enzimas encargadas de romper los polisacáridos como celulosa y hemicelulosa en sus azúcares monoméricos constituyentes, que son susceptibles de ser fermentados posteriormente, estos azúcares monoméricos son principalmente la glucosa que se obtiene de la celulosa y las pentosas

que se obtienen de la hemicelulosa (29). La importancia de realizar un pretratamiento se puede observar si se compara la cantidad de azúcares obtenidos de la biomasa sin pretratar, con la biomasa de los demás pretratamientos. En la figura 4.9 se observa que la cantidad de grados Brix obtenida de la biomasa sin pretratar después de la hidrólisis enzimática fue de 3°Bx, siendo esta la menor cantidad de azúcares generada, comparada con la biomasa que fue sometida a un pretratamiento químico, el cual permitió degradar la lignina, la misma que se encarga de generar las barreras en las paredes celulares de la planta, contra un ataque enzimático (22).

Al igual que en los pretratamientos, se analizó la concentración de azúcares después de la hidrólisis enzimática debido a un monitoreo, por lo que no se puede hablar de una significancia estadística entre la cantidad de azúcares en cada una de las hidrólisis.

4.6. Producción de etanol

Una vez realizados los diferentes pretratamientos de cuatro horas a la biomasa de la mazorca de cacao, seguido de la hidrólisis enzimática a cada uno de estos, se realizó una fermentación del filtrado después de dicha hidrólisis, para que las levaduras alcohólicas con la presencia de azúcares más simples como la glucosa, empiecen a fermentar y producir etanol (31). Para determinar la cantidad de alcohol producido, se analizó la concentración de alcohol mediante GC-MS.

Mediante la curva de calibración de la figura 6.4 de anexos, se calculó en base al área la concentración de etanol que se produjo. Dichos resultados se muestran en la figura 4.12.

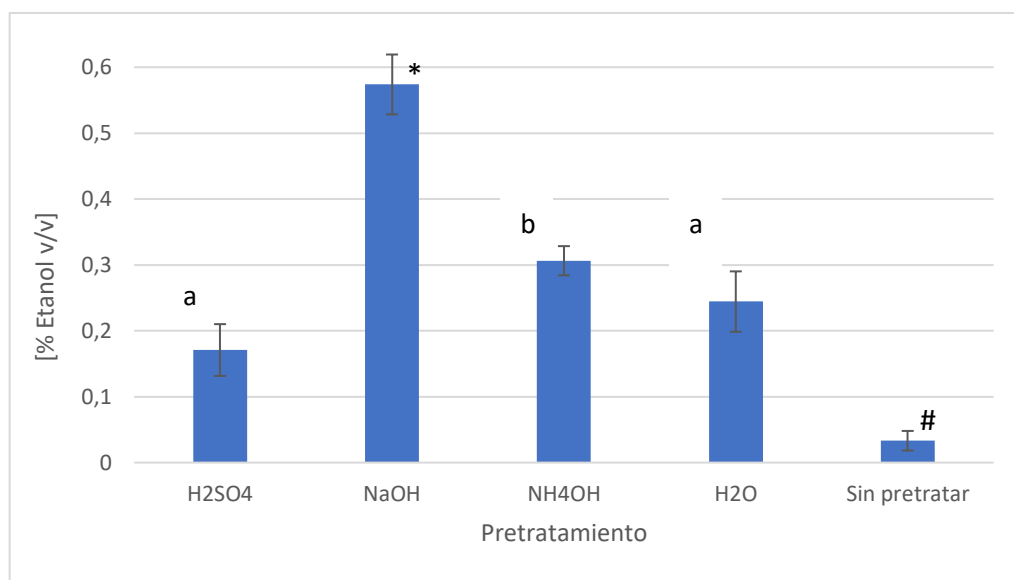


Figura 4.12. Concentraciones de etanol obtenido después del proceso de fermentación de diferentes pretratamientos a la biomasa lignocelulósica de la mazorca de cacao

(a) y (b) Los pretratamientos con las mismas letras no representan diferencias estadísticamente significativas

(*) y (#) Representan las cantidades máximas y mínimas de etanol producidas entre todos los pretratamientos ($p < 0.05$)

Como se puede apreciar en la figura 4.12, se tiene una mayor producción de etanol cuando se realiza un pretratamiento a la biomasa de la cáscara de la mazorca de cacao, en comparación con la biomasa sin pretratar, donde se produjo apenas $(0,03 \pm 0,01)\%$ de etanol. El pretratamiento con mayor producción de etanol fue el del hidróxido de sodio, en el cual se obtuvo una concentración de $(0,57 \pm 0,04)\%$ v/v de etanol en 50ml de la solución proveniente de la hidrólisis enzimática; este resultado concuerda con los análisis anteriores de caracterización de celulosa y lignina, como también de azúcares, ya que la biomasa pretratada con hidróxido de sodio tuvo la mayor concentración de celulosa liberada y la mayor concentración de lignina degradada, lo que provocó que haya mayor disponibilidad de azúcares durante la fermentación. Por ende, al haber mayor presencia de azúcares como la celulosa y hemicelulosa, estos fueron degradados a azúcares más simples en la hidrólisis enzimática, aumentando así la producción de etanol por el procesos de fermentación de dichos azúcares por las levaduras (29). El hidróxido de amonio al ser una base débil, produjo menor cantidad de etanol que el hidróxido de sodio, obteniendo una concentración de etanol del $(0,31 \pm 0,022)\%$ v/v. Esta concentración es estadísticamente similar a la obtenida mediante el pretratamiento con agua, donde se puede observar que a pesar que el pretratamiento con agua no produjo un gran aumento en la concentración de celulosa comparado con los demás pretratamientos, este tuvo un

aumento significativo en la concentración de azúcares en la hidrólisis enzimática, permitiendo así una producción de etanol del $(0,24 \pm 0,05)\%v/v$. Por otra parte, la concentración de etanol producida por el pretratamiento con ácido sulfúrico fue del $(0,17 \pm 0,03)\%v/v$, el cual es menor al del agua, pero estadísticamente no es significativamente diferente. En base a otros estudios se ha obtenido que con un pretratamiento de ácido sulfúrico a 190°C y al $1,2\%v/v$ al pasto maralfalfa, se obtuvo una concentración de $11,7\%v/v$ de etanol por 6g de biomasa pretratada (5). Otros estudios donde se realizó un pretratamiento básico a la cáscara de piña y de naranja con hidróxido de sodio al $2\%p/v$, se obtuvo una producción de etanol del $17,52\%v/v$ para la cáscara de naranja y un $1,54\%v/v$ para la cáscara de piña, donde la cáscara de naranja tuvo el mayor porcentaje debido a que genero mayor cantidad de azúcares reductores en la hidrólisis enzimática (26). Finalmente, a un estudio realizado a la madera *Eucalyptus camaldulensis*, con una solución de amoníaco al $15\%v/v$, se tuvo una producción de etanol del $2,6\%v/v$. Como se puede observar todos los pretratamientos aplicados a otras biomásas, con las mismas condiciones que los aplicados para la cáscara de cacao, generan un porcentaje mucho mayor al generado por esta biomasa, esto se puede deber al proceso de hidrólisis enzimática, en donde la producción de azúcares es mínima, lo que reduce notablemente el proceso de fermentación alcohólica; esta falla en el proceso de hidrólisis enzimática se puede deber a la concentración de enzimas, la cantidad de biomasa o el tiempo de hidrólisis, por lo que se debería plantear un diseño experimental donde se determine las mejores condiciones para este proceso.

5. Conclusiones y recomendaciones

En la presente investigación se logró realizar una caracterización inicial a la biomasa lignocelulósica de la cáscara de la mazorca del cacao CCN51, en la que se determinó principalmente celulosa y lignina. Mediante el diseño de experimento planteado se logró determinar las condiciones óptimas de pretratamiento a la cáscara de cacao, las cuales fueron 4 horas de reflujo con una relación sólido-líquido de 1/15. Obteniendo como mejor pretratamiento al hidróxido de sodio a una concentración del 2%p/v; en el cual se obtuvo un aumento en la concentración de celulosa de un $(24,46 \pm 3,05)\%$ a $(55,19 \pm 1,64)\%$, mientras que la lignina se redujo de $(46,61 \pm 2,89)\%$ a $(24,43 \pm 4,01)\%$. Se logró determinar las condiciones para la hidrólisis enzimática, las cuales fueron mediante el uso de una solución buffer de citrato de sodio 50mM a un pH de 4.8 y a una temperatura de 55°C. Finalmente, mediante la determinación de la concentración de alcohol generada después de la fermentación con el uso de GC-MS, se puede comprobar que es necesario aplicar un pretratamiento a la biomasa de la cáscara de cacao para la generación de alcohol, en este caso se obtuvo la mayor concentración de alcohol con un pretratamiento de hidróxido de sodio, mientras que con la biomasa sin pretratamiento generó la menor concentración de alcohol. Por lo que se puede concluir que se puede generar bioetanol a partir de la biomasa de la cáscara de cacao, debido a sus propiedades lignocelulósicas y a la aplicación de un pretratamiento con hidróxido de sodio y una hidrólisis enzimática.

Se recomienda que en todos los procesos en el que incluye lavado mediante filtración, se lo debe realizar de una manera rigurosa, especialmente después de un pretratamiento, ya que, si la biomasa filtrada y secada contiene aun restos del reactivo utilizado en el proceso de pretratamiento, este puede afectar en el pH durante la hidrólisis enzimática, alterando así las condiciones del medio para las enzimas. Por otro lado, se recomienda que los procesos de hidrólisis enzimática y de fermentación se realicen bajo condiciones de asepsia, en una cámara de flujo laminar con una adecuada ventilación.

Sería importante llevar a cabo un diseño experimental para maximizar la hidrólisis enzimática donde se evalué el tipo de enzimas, la concentración de estas enzimas y el tiempo de hidrólisis; para lograr un aumento en la concentración de azúcares, aumentando así la producción de etanol. Otro proceso que se debería probar es el de sacarificación y fermentación simultánea (SFS), donde se mezclan las levaduras y las enzimas en un solo medio, donde las enzimas generan azúcares reductores y las levaduras

absorben estos para la producción de etanol. Finalmente se recomienda utilizar otro tipo de levaduras, como levaduras para whisky o vodka, las cuales son mucho más eficientes que las levaduras de cervezas utilizadas en esta investigación.

6. Anexos



Figura 6.1. Sistema de reflujo para los pretratamientos a la mazorca de la cáscara de cacao

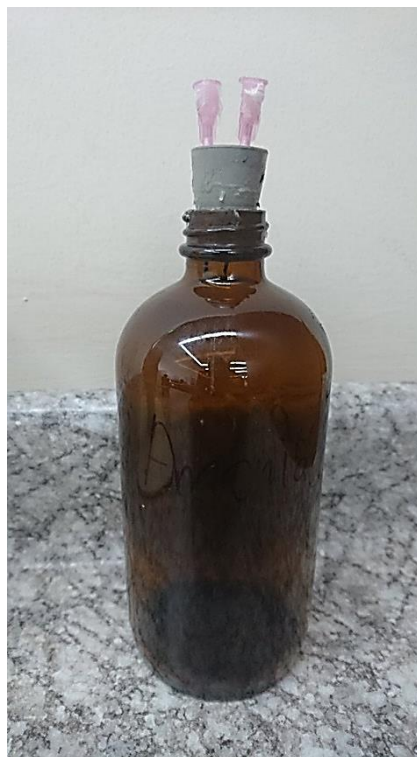


Figura 6.2. Sistema usado para la realización de una hidrólisis enzimática



Figura 6.3. Sistema usado para el proceso de fermentación alcohólica

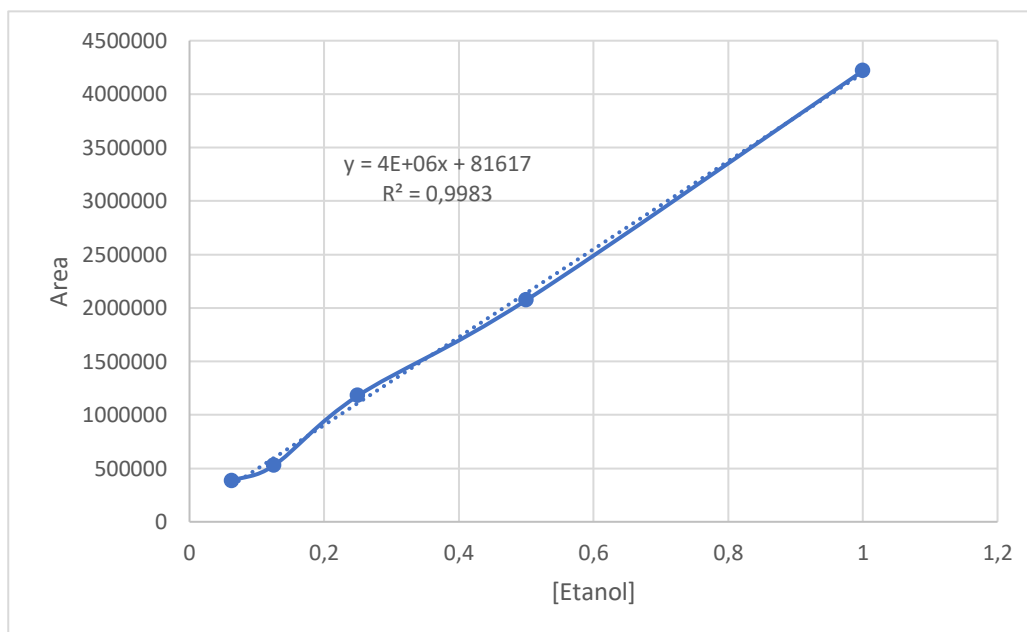


Figura 6.4. Curva de calibración del GC-MS área vs. concentración de etanol

7. Referencias y bibliografía

1. Méndez AM. BIOCONVERSIÓN DE HEMICELULOSA [Internet]. Universidad de Santiago de Chile. 2014. Available from: <https://es.slideshare.net/anymarim/bioconversin-de-hemicelulosa>
2. Lilibeth, López; Acosta Cárdenas, Alejandro; Gelves Zambrano R. Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Rev Fac Ing Univ Antioquia* [Internet]. 2013 [cited 2017 Oct 14];(69):317–26. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-62302013000400025&lng=en&nrm=iso&tIng=es
3. Fontecha LM. Evaluación de los pretratamientos con ácido sulfúrico diluido y AFEX en la biomasa lignocelulósica del tipo pasto gigante “ *Pennisetum Sp.* ” 2011;83.
4. Cortínez V. Comparación De Pretratamientos En Residuos Forestales Para La Producción De Bioetanol De Segunda Generación: Hidrólisis Ácida Y Líquidos Iónicos. Universidad de Chile. 2010.
5. Mateus, Lady, Hernández O, Velásquez M, Díaz JDJ. Evaluación del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido del pasto maralfalfa (*Pennisetum glaucum* x *Pennisetum purpureum*) para la producción de etanol. *Rev Colomb Biotecnol.* 2012;14(1):146–56.
6. El chocolate protege al corazón - BBC Mundo [Internet]. 2011 [cited 2017 Oct 13]. Available from: http://www.bbc.com/mundo/noticias/2011/08/110830_chocolate_corazon_men.shtml?MOB
7. Anecacao Ecuador. Cacao Nacional [Internet]. 2015 [cited 2017 Oct 13]. Available from: <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/cacao-nacional.html>
8. Invest Manabi. Cacao [Internet]. 2012 [cited 2018 Jan 29]. Available from: <http://www.manabi.gob.ec/investmanabi/Exportaciones.php>
9. López Castro VC. El tratamiento de desechos sólidos de derivados del cacao y productividad en la planta de chocolates Más Choco [Internet]. 2014. Available from: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/8587/1/MSc.29.pdf>
10. El Telegrafo. Ecuador lidera la producción de cacao fino de aroma. 2016 [cited 2017 Oct 13]; Available from: <http://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/8/ecuador-lidera-la-produccion-de-cacao-fino-de-aroma>
11. Baena LM, Garcia NA. obtención y caracterización de fibra dietaria a partir de cascarilla de las semillas tostadas de *Theobroma cacao* L. de una industria chocolatera colombiana. Universidad Tecnológica de Pereira; 2012.
12. Universidad de los Andes (Mérida VC de IA, Díaz Morales KM. El mercado mundial del cacao. *SciELO* [Internet]. 2004 [cited 2018 Jan 29];9(18):47–59. Available from: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-03542004000100004
13. United Cacao. Mercado Mundial del Cacao [Internet]. 2015 [cited 2018 Jan 29]. Available from: <http://www.unitedcacao.com/index.php/es/corporate-profile-es/global-cocoa-market-es>

14. International Cocoa Organization. Production of cocoa beans [Internet]. 2017 [cited 2018 Jan 29]. Available from: https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related-documents/46-statistics-production.html
15. Vallejo J. Ecuador, entre los cinco mayores productores de cacao del mundo. El Ciudadano [Internet]. 2014; Available from: <http://www.elciudadano.gob.ec/ecuador-entre-los-cinco-mayores-productores-de-cacao-del-mundo/>
16. Instituto de Promoción de Exportadores e Inversiones. Cacao y Elaborados [Internet]. Pro Ecuador. 2016 [cited 2018 Jan 29]. Available from: <https://www.proecuador.gob.ec/compradores/oferta-exportable/cacao-y-elaborados/>
17. Pérez Jiménez JA. Estudio del pretratamiento con agua caliente en fase líquida de la paja de trigo para su conversión biológica a etanol. 2008. 234 p.
18. Cardona EM, Rios JA, Peña JD, Rios LA. Pretratamiento Alcalino de Pasto Elefante (*Pennisetum sp*) y King Grass (*Pennisetum hybridum*) Cultivados en Colombia para la Producción de Bioetanol. *Inf Tecnol*. 2013;24(5):69–80.
19. Oliva J. Efectos de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus* [Internet]. 2003. 1-166 p. Available from: <http://biblioteca.ucm.es/tesis/bio/ucm-t26833.pdf>
20. Morales HFM. Producción de Bioetanol a Partir de Material Lignocelulósico de Moringa Oleífera. *Univ Nac Colomb* [Internet]. 2014; Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/45408/1/80765033.2014.pdf>
21. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de enfermedades. Resumen de Salud Pública: Anhídrido sulfúrico y ácido sulfúrico (Sulfur Trioxide and Sulfuric Acid) | PHS | ATSDR [Internet]. 2016 [cited 2018 Apr 7]. Available from: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs117.html
22. Sánchez Riaño AM, Gutiérrez Morales, A.I.; Muñoz Hernández, J. A. y Rivera Barrero CA. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos Bioethanol Production from agroindustrial lignocellulosic byproducts. 2010;61–91.
23. Perry R. Perry's Chemical Engineer's Handbook. Séptima. The McGraw-Hill Company, editor. 1999.
24. Cherubini F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers Manag* [Internet]. 2010;51(7):1412–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>
25. Domínguez-Domínguez MM, Álvarez-Castillo A, Granados-Baeza M, Hernández-Campos F. Estudio de la cinética del pretratamiento e hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar. *Iberoam Polim*. 2012;13(4):200–11.
26. Benítez LT, Tovar CT, Ortiz ÁV, Dunoyer AT, Alvear M, Castillo C, et al. Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña. *Rev Educ en Ing* [Internet]. 2010;5:120–5. Available from: <http://www.educacioningenieria.org/index.php/edi/article/view/104>

27. Renewable Fuels Association. Industry Statistics : World Fuel Ethanol Production [Internet]. 2016 [cited 2018 Jan 27]. Available from: <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454099103927-61e598f7-7643>
28. Pandey A. Handbook of Plant - based Biofuels. Taylor&Fra. Washington; 2009.
29. Abril AJ. Etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Cana de azucar; 2014.
30. Revelo Rodriguez DA. Estudio de la hidrólisis y la fermentación alcohólica de residuos de biomasa seca de madera de balsa, palmito y bagazo para la obtención de bioetanol. UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO; 2014.
31. Mabel Viñals-Verde, Antonio Bell-García, Georgina Michelena-Álvarez MR-M. Obtencion de etanol a partir de biomasa lignocelulosica. ICIDCA. 2012;46:7–16.
32. Instituto de Desarrollo de Energías y Materiales Alternativos. Manual de procedimientos y seguridad. Quito; 2016.
33. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC international. AOAC Inter. Gaithersburg; 2012.
34. Isern Hidalgo X. La humedad en la biomasa : herramientas de medida y control. energética XXI. 2014.
35. Heredia S. “Estudio del efecto de las condiciones de los tratamientos químicos en el proceso de obtención de andamios porosos para aplicaciones biomédicas.” 2015.
36. ExpotechUSA. A guide to Kjeldahl Nitrogen Determination Methods and Apparatus. Labconco. 1998.
37. Elías O. INFORME: MÉTODO SOXHLET EN ALIMENTOS. 2008.
38. Hernandez AM, Bojaca R del P, Duque ME. Determinación de grasas y aceites en aguas por el método soxhlet. Ideam. 2007.
39. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. Gaithersburg; 1997.
40. VLEP Scientifica. Manual de operación. Utretra; 2016.
41. Gómez EA, Ríos LA, Peña JD. Efecto del Pretratamiento de Biomasa Maderera en el Rendimiento a Etanol. Inf Tecnol. 2013;24(5):113–22.
42. CIMAV. Microscopia Electronica de Barrido - CIMAV Unidad Monterrey [Internet]. Centros de Investigación en Materiales Avanzados, S. C. 2008 [cited 2018 Apr 23]. Available from: <http://mty.cimav.edu.mx/sem/>
43. Billy Danai Cruz. Grados Brix [Internet]. 2008 [cited 2018 Apr 8]. Available from: <https://es.scribd.com/doc/263326661/Grados-Brix>
44. KRÜSS. Refractómetro – Medición Brix en la industria de bebidas y zumos [Internet]. 2011. 2011. Available from: http://www.kruess.com/documents/Applikationsberichte/AP130710_001_Medicion_Brix_en_la_industria_de_bebidas_ES.pdf

45. Gutiérrez MC, Droguet M. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor M.C. Boletín Intexter del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial. 2002. p. 35–41.
46. Omar T. Evaluación del efecto de la pulpa de café (*coffea arábica*) en el incremento de la eficiencia biológica de la cepa inireb-8 de *pleurotus ostreatus* utilizando cascara de cacao (*theobroma cacao*) y bambu (*bambusa vulgaris* var. *striata*) como sustratos. Universidad de San Carlos de Guatemala; 2014.
47. Nguyen MT, Choi SP, Lee J, Lee JH, Sim SJ. Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *J Microbiol Biotechnol*. 2009;19(2):161–6.
48. Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzapple M, Ladisch MR, Lee YY. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour Technol*. 2005;96(18 SPEC. ISS.):1959–66.
49. Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*. 2005;96(6):673–86.
50. Tae Hyun Kim, Jun Seok Kim, Changshin Sunwoo YYL. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. *Bioresour Technol*. 2003;90(6):39–47.
51. Suh H, Rodríguez E. Determinación del pH y Contenido Total de Azúcares de Varias Bebidas No Alcohólicas: su Relación con Erosión y Caries Dental. *Odonto Investig* [Internet]. 2016;1:18–30. Available from: https://www.usfq.edu.ec/publicaciones/odontoinvestigacion/Documents/odontoinvestigacion_n005/oi_005_002.pdf