

# INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE

RECONOCIMIENTO DE VALIDEZ OFICIAL DE ESTUDIOS DE NIVEL  
SUPERIOR, SEGÚN ACUERDO SECRETARIAL 15018, PUBLICADO EN EL  
DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN EL 29 DE NOVIEMBRE DE 1976.

---



“PRETRATAMIENTO DE BAGAZO DE AGAVE MEDIANTE  
OXIDACIÓN AVANZADA USANDO OZONO PARA SU USO  
EN GENERACIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES”

---

## **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**INGENIERA QUÍMICA**

P R E S E N T A

Mariel Amacalli Alejandro Paniagua

DIRECTOR: Dra. Elizabeth León Becerril  
ASESORES: M.C. Daryl Rafael Osuna Laveaga  
Dra. Alejandra López Santiago  
TLAQUEPAQUE, JALISCO  
Abril 2019

---

---

## **Agradecimientos**

A la beca otorgada a través del proyecto “Clúster de Biocombustibles Gaseosos” financiado por el Fondo Sectorial CONACYT-Secretaría de Energía-Sustentabilidad Energética, clave: 247006.

Al Centro de Investigación y Asistencia y Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C (CIATEJ) por haberme brindado una plataforma de desarrollo profesional de calidad.

Al ITESO por darme la oportunidad de superarme a mí misma y poder realizar este trabajo, así como el apoyo que me otorgó durante la realización del mismo.

A la Doctora Elizabeth León Becerril por la oportunidad de aprendizaje y desarrollo, junto con su paciencia durante el proceso de investigación y terminación de este trabajo.

Al Maestro Daryl Rafael Osuna Laveaga por su apoyo y sus enseñanzas durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de la Unidad de Tecnología Ambiental de CIATEJ por su amistad y apoyo.

## **Derechos de propiedad intelectual**

Esta Tesis de Licenciatura fue realizada en la Unidad de Tecnología Ambiental del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), bajo la dirección de la Dra. Elizabeth León Becerril, en el marco del proyecto “Clúster de Biocombustibles Gaseosos” financiado por el Fondo Sectorial CONACYT-Secretaría de Energía-Sustentabilidad Energética, clave: 247006. La idea original de este trabajo de investigación es de la Dra. Elizabeth León Becerril y del Dr. Alberto López López (Q.E.P.D.).

Esta tesis contiene extractos e ideas originales de informes técnicos del proyecto antes mencionado. Como referencia se utilizó una solicitud de patente ante el Instituto Mexicano de Propiedad Industrial, No. de Expediente MX/a/2015/014521 por lo que cualquier uso total o parcial de la información contenida en esta tesis con fines no académicos queda condicionado a la autorización previa y escrita del CIATEJ.



## **Publicaciones asociadas**

### **Presentación oral en Congreso**

Alejandro Paniagua, Mariel Amacalli; Osuna Laveaga, Daryl Rafael; Arias Guzmán, Diana Laura; León Becerril, Elizabeth. (2018). Pretratamiento de bagazo de agave mediante oxidación avanzada usando ozono para su uso en generación de biocombustibles. XXXIX Encuentro Nacional de la AMIDIQ, San José del Cabo, B.C.S., México, 1 al 4 de Mayo del 2018.

### **Memoria en Extenso**

Alejandro Paniagua, Mariel Amacalli; Osuna Laveaga, Daryl Rafael; Arias Guzmán, Diana Laura; León Becerril, Elizabeth. (2018). Pretratamiento de bagazo de agave mediante oxidación avanzada usando ozono para su uso en generación de biocombustibles. Memorias en extenso del XXXIX Encuentro Nacional de la AMIDIQ, ISBN 978-607-95993-6-6. Pags. ENE88 - ENE91. San José del Cabo, B.C.S., México, 1 al 4 de Mayo del 2018.



## Resumen

El bagazo de agave es uno de los principales residuos en la producción del tequila que no recibe una disposición adecuada afectando el ambiente, con el fin de darle valor agregado, el bagazo se ha usado como materia prima para la producción de biocombustibles, entre otros usos.

El bagazo es un material lignocelulósico compuesto de celulosa, hemicelulosa y lignina, la composición de dichos elementos varía dependiendo el tipo de material siendo del 40-50% celulosa (principalmente glucosa), 25-33% hemicelulosa (xilosa, arabinosa) y 20-30% lignina. Los azúcares presentes en el material le confieren un valor agregado y potencial en la producción de biocombustibles como hidrógeno, metano o etanol. Sin embargo, los enlaces entre la celulosa y hemicelulosa con la lignina son de tipo éter, dichos enlaces le confieren al material cierta recalcitrancia que dificultan el acceso a los azúcares contenidos en el mismo. Esta limitación hace necesario aplicar un pretratamiento que incremente la disponibilidad de los azúcares reductores, para que éstos puedan ser usados.

En este trabajo se evaluó un pretratamiento químico mediante la aplicación de ozono en el bagazo de agave, evaluando el efecto de la dosis de ozono y el tamaño de partícula del material en la recuperación de celulosa (como glucosa) y hemicelulosa (como xilosa), así como al consumo de ozono.

Se evaluaron tres tamaños de partícula del material 600, 850 y 1200  $\mu\text{m}$  y tres dosis de ozono 60, 90 y 120  $\text{mg O}_3/\text{g}_{\text{bag}}$ . El pretratamiento se realizó a temperatura y presión ambiente en un reactor empacado, controlando el flujo de ozono en 1.4 L/min y el tiempo de reacción de 45 a 95 min.

El pretratamiento con ozono permitió alcanzar una máxima recuperación de celulosa 91.37% para un tamaño de partícula de 600  $\mu\text{m}$  y dosis de 60  $\text{mg O}_3/\text{g}_{\text{bag}}$ , mientras que para hemicelulosa fue de 90.59% para el mismo tamaño de partícula y dosis de 90  $\text{mg O}_3/\text{g}_{\text{bag}}$ . La máxima degradación de lignina fue del 52.7% bajo las condiciones de 600  $\mu\text{m}$  con una dosis de 90  $\text{mg O}_3/\text{g}_{\text{bag}}$ .

El mayor consumo de ozono fue del 83% para un tamaño de partícula de 600  $\mu\text{m}$  y dosis de 60 mg  $\text{O}_3/\text{g}_{\text{bag}}$ . El ozono consumido influye directamente en la degradación de lignina, al deslignificar el material, aumenta la disponibilidad de los azúcares, esto permitirá el aprovechamiento del bagazo de agave en la producción de biocombustibles.

El pretratamiento de bagazo de agave con ozono permite degradar la lignina hasta un 50% y recuperar al menos el 90% de los azúcares del material, con un consumo del 80% de ozono. De esta forma, el bagazo podrá ser usado posteriormente para la obtención de biocombustibles.

## Contenido

Resumen .....	vii
Contenido .....	ix
Glosario .....	xi
Índice de Tablas y Figuras .....	xiii
Índice de Tablas .....	xv
Índice de Figuras .....	xvi
Índice de ecuaciones .....	xviii
1. Introducción .....	1
1.1. Antecedentes .....	4
1.1.1. Material lignocelulósico .....	5
1.1.2. Pretratamientos .....	9
1.2. Planteamiento del problema .....	17
1.3. Justificación .....	17
1.4. Hipótesis .....	18
1.5. Objetivos .....	19
1.6. Fundamentos teóricos .....	19
2. Metodología .....	25
2.1. Acondicionamiento de la muestra .....	27
2.2. Caracterización del bagazo de agave .....	28
2.3. Pretratamiento con ozono .....	28
2.4. Análisis de datos .....	30
2.5. Diseño experimental estadístico .....	31
3. Resultados y análisis .....	33
3.1. Consumo de ozono durante el pretratamiento .....	34
3.2. Evaluación del pretratamiento del bagazo de agave con ozono .....	36
3.3. Optimización estadística .....	40
Conclusiones .....	45
Bibliografía .....	49
Anexos .....	59
Anexo A .....	61
Anexo B. Resultados .....	66



## **Glosario**

ANOVA	Análisis de varianza
BAG	Bagazo de agave
CRT	Consejo Regulador del Tequila
GWh	Gigawatt-hora (medida de energía eléctrica)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución)
HMF	Hidroximetilfurfural
LAERFTE	Ley para el Aprovechamiento de Energías Renovables y el Financiamiento de la Transición Energética
LIA	Lignina insoluble ácida
LSA	Lignina soluble ácida
LSD	Least significant difference (Análisis de diferencia menos significativa)
NREL	National Renewable Energy Laboratory (Laboratorio Nacional de Energías Renovables)
ODW	Oven-dry weight (peso de muestra secada en el horno)
ST	Sólidos totales



# Índice de Tablas y Figuras



## Índice de Tablas

Tabla 1. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en diferentes materiales en base seca (Sun y Cheng, 2002; Lacerda, 2014) .....	7
Tabla 2. Rendimiento de carbohidratos de material lignocelulósico sometido a un pretratamiento y a una posterior hidrólisis enzimática.....	15
Tabla 3. Ventajas y desventajas de diferentes pretratamientos (Kumar et al., 2009; Agbor et al., 2011).....	16
Tabla 4. Rendimientos de azúcares después del pretratamiento con ozono e hidrólisis enzimática. ....	23
Tabla 5. Diseño experimental para análisis considerando el contenido de humedad constante a 45 % p/p.....	31
Tabla 6. Composición de bagazo de caña y agave (% p/p). ....	36
Tabla 7. Composición del bagazo de agave después del pretratamiento usando ozono. ....	37
Tabla 8. Recuperación de azúcares y degradación de lignina .....	39
Tabla 9. Caracterización de material lignocelulósico pretratado con ozono .....	40
Tabla 10. Análisis de varianza para el consumo de ozono .....	41
Tabla 11. Análisis de varianza para el contenido deLIA .....	42

## TABLAS DE ANEXO B

Tabla B. 1. Análisis de varianza para LSA .....	70
Tabla B. 2. Análisis de rangos múltiples para LSA.....	70
Tabla B. 3. Análisis de varianza para celulosa .....	71
Tabla B. 4. Análisis de rangos múltiples para celulosa .....	72
Tabla B. 5. Análisis de varianza para hemicelulosa .....	72

## Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de la pared celular vegetal y sus componentes (Murphy y McCarthy, 2005).....	6
Figura 2. Estructura de la hemicelulosa (Pradera, 2016) .....	8
Figura 3. Estructura molecular de la celulosa, enlaces intramoleculares (óvalo inferior) e intermoleculares (óvalo superior). Adaptado de (Abreu-Sherrer, 2013)..	9
Figura 4. a) Mecanismo de formación de furfural a partir de la xilosa. b) Mecanismo de formación de 5-hidroximetilfurfural (HMF) a partir de la glucosa. Adaptado de (Hu y Ragauskas, 2012) .....	12
Figura 5. Sistema de reacción y ciclo de formación del ozono atmosférico (Doadrio-Villarejo, 2013). .....	20
Figura 6. Diagrama del flujo de oxígeno para formar ozono a través de un arco eléctrico (Instituto del agua y las Ciencias, 2013) .....	21
Figura 7. Diagrama general del sistema de reacción del ozono por ambas vías (Arenas-Cárdenas, 2015).....	22
Figura 8. Esquema de metodología .....	27
Figura 9. Diagrama del sistema de ozonación .....	29
Figura 10. Ozono residual y consumido en el pretratamiento .....	34
Figura 11. Consumo de ozono en el reactor, dosis de 60 mg O <sub>3</sub> /g <sub>bag</sub> , tamaño de partícula de 600 y 1200 µm.....	35
Figura 13. Análisis del efecto del tamaño de partícula.....	41
Figura 14. Análisis del efecto de la dosis de ozono.....	42
Figura 15. Efectos principales de la dosis de ozono y el tamaño de partícula sobre el contenido de LIA.....	43
Figura 16. Diagrama de superficie de respuesta del porcentaje de recuperación de celulosa.....	44
Figura 17. Diagrama de superficie de respuesta de la recuperación de hemicelulosa.....	44

## FIGURAS DE ANEXO B

Figura B. 1. Consumo de ozono, dosis de 120 mg O <sub>3</sub> /g <sub>bag</sub> .....	66
Figura B. 2. Consumo de ozono, dosis de 90 mg O <sub>3</sub> /g <sub>bag</sub> .....	67
Figura B. 3 Consumo de ozono, dosis de 60 mg O <sub>3</sub> /g <sub>bag</sub> .....	67
Figura B. 4. Concentración de ozono residual, tamaño de partícula de 600 µm... 68	
Figura B. 5. Concentración de ozono residual, tamaño de partícula de 850 µm... 69	
Figura B. 6 Concentración de ozono residual, tamaño de partícula de 1200 µm. . 69	
Figura B. 7. Efectos principales de la dosis de ozono y el tamaño de partícula sobre el contenido de LSA .....	71
Figura B.8. Efectos principales de la dosis de ozono y el tamaño de partícula sobre el contenido de celulosa .....	72
Figura B. 9. Residuales de LIA con respecto a la dosis de ozono.....	73
Figura B. 10. Residuales de LIA con respecto al tamaño de partícula. ....	73
Figura B. 11. Gráfica de independencia .....	74
Figura B. 12 Gráfica de normalidad.....	74

## Índice de ecuaciones

Ecuación 1.....	30
Ecuación 2.....	31
Ecuación 3.....	31
Ecuación 4.....	31
Ecuación 5.....	31

## ECUACIONES DE ANEXO A

Ecuación A. 1 .....	62
Ecuación A. 2 .....	62
Ecuación A. 3 .....	62
Ecuación A. 4 .....	63
Ecuación A. 5 .....	63
Ecuación A. 6 .....	64
Ecuación A. 7 .....	64
Ecuación A. 8 .....	65
Ecuación A. 9 .....	65

# **1. Introducción**



La viabilidad económica de los combustibles fósiles está siendo afectada por su alta demanda y por provenir de recursos no renovables; se estima que las reservas petroleras podrán abastecer el mercado por un periodo más de 40 a 50 años (Clemente, 2015). La obtención y refinación del petróleo tiene un alto impacto en el ambiente contribuyendo al cambio climático y al agotamiento de recursos naturales y ecosistemas (Kumar y Murthy, 2011; Clemente, 2015). El bioetanol es el primer biocombustible registrado, en 1896 Ford adaptó vehículos para funcionar con etanol producido a partir de granos de maíz (Zaldivar et. al., 2001; Geographic, 2010) y Brasil es uno de los pioneros en la producción de bioetanol a partir de aceite de semillas desde 1905 (Maciel-Álvarez, 2009). Sin embargo, la producción y el uso de biocombustibles no progresaron hasta 1977, por la crisis petrolera mundial, en que se creó el Programa Nacional del Alcohol (PROÁLCOOL), para incentivar el desarrollo de motores compatibles con mezclas de etanol y gasolina (Maciel-Álvarez, 2009). Hoy en día, el biogás es uno de los biocombustibles que ha despertado interés, éste puede producirse a través de la descomposición anaerobia de materia orgánica biodegradable. El proceso de producción de biogás, a la vez que genera una fuente de energía alternativa, otorga un valor agregado y permite el tratamiento de residuos biodegradables. El biogás puede ser utilizado en la generación de energía eléctrica o energía térmica u otros sistemas de combustión a gas (Severiche-Sierra y Acevedo-Barrios, 2013).

En México se ha incentivado el desarrollo y la investigación de generación de biocombustibles (Secretaría de Energía, 2014); la Ley para el Aprovechamiento de Energías Renovables y el Financiamiento de la Transición Energética (LAERFTE) ha propuesto ampliar la capacidad de generación de electricidad a partir de energías renovables para alcanzar el 33% del total en el 2018; la generación de electricidad a partir de fuentes fósiles no deberá rebasar el 65% del total para el 2024, lo que representa un desafío en la diversificación energética nacional (Secretaría de Energía, 2014). Pese a los grandes avances tecnológicos en la materia, es necesario continuar con la investigación de los combustibles alternos y los biocombustibles para poder llegar a su completa implementación a nivel global utilizando métodos que no impacten negativamente.

## 1.1. Antecedentes

Los biocombustibles se clasifican en primera, segunda y tercera generación, y dependiendo del estado físico, en líquidos (bioetanol), sólidos (carbón) y gaseosos (hidrógeno y metano) (Maciel-Álvarez, 2009; Dutta et al., 2014).

El biocombustible de primera generación se obtiene de materia prima como granos, semillas, aceites vegetales, maíz, almidones, caña de azúcar, aceite de coco, semilla de girasol, entre otros. La ventaja de este tipo de materia prima es que los azúcares fermentables son de fácil acceso; sin embargo, la producción de combustibles compite con el sector alimentario. Los biocombustibles de segunda generación se obtienen de materiales lignocelulósicos como residuos de industrias de aceite y de harina, madera, residuos agroindustriales, entre otros (Demirbas, 2009; Sims et al., 2009; Gitifar et al., 2013). En el caso de los materiales lignocelulósicos, debido a la recalcitrancia del material, la biodisponibilidad de los azúcares es limitada. Esto implica modificar la estructura y disminuir la recalcitrancia (romper los enlaces de la matriz) manteniendo los carbohidratos disponibles para un posterior proceso biotecnológico para la producción de biocombustibles (Demirbas, 2009; Nigam y Singh, 2011). Finalmente, los biocombustibles de tercera generación son aquellos producidos a partir de microorganismos y microalgas. Estos tienen una alta capacidad para biosintetizar y almacenar grandes cantidades de ácidos grasos lo cual los hace ideales para la producción de aceites (Nigam y Singh, 2011).

La búsqueda de fuentes de energía renovables se ha convertido en una prioridad para el desarrollo sustentable, que no impacte de manera negativa al ambiente, al sector salud ni al sector alimentario. Ese último factor ha propiciado el uso de residuos agroindustriales (lignocelulósicos) como el bagazo de agave el cual es generado en el proceso de producción y preparación de tequila.

El bagazo de agave es la fibra residual que queda después de cocinar, moler y extraer el jugo fermentable de la piña del *Agave tequilana* Weber que se utiliza. Se considera que el 40% del peso total del agave consumido durante el proceso

corresponde al bagazo residual, esto provoca una generación de grandes volúmenes del residuo ya que para producir un litro de tequila se generan alrededor de 1.5 a 2 kg de bagazo de agave en base húmeda. Actualmente, el tequila ha tenido un auge en su demanda tanto a nivel nacional como internacional con una producción anual de tequila de aproximadamente 226.5 millones de litros anuales según los datos del Consejo Regulador del Tequila (CRT), provocando que la disposición inadecuada del bagazo genere un impacto negativo en el ambiente. El bagazo ha sido usado para composteo y como alimento de ganado; con el fin de darle un valor agregado se ha investigado su uso potencial para la generación de biocombustibles (CRT, 2004; Íñiguez et al., 2005).

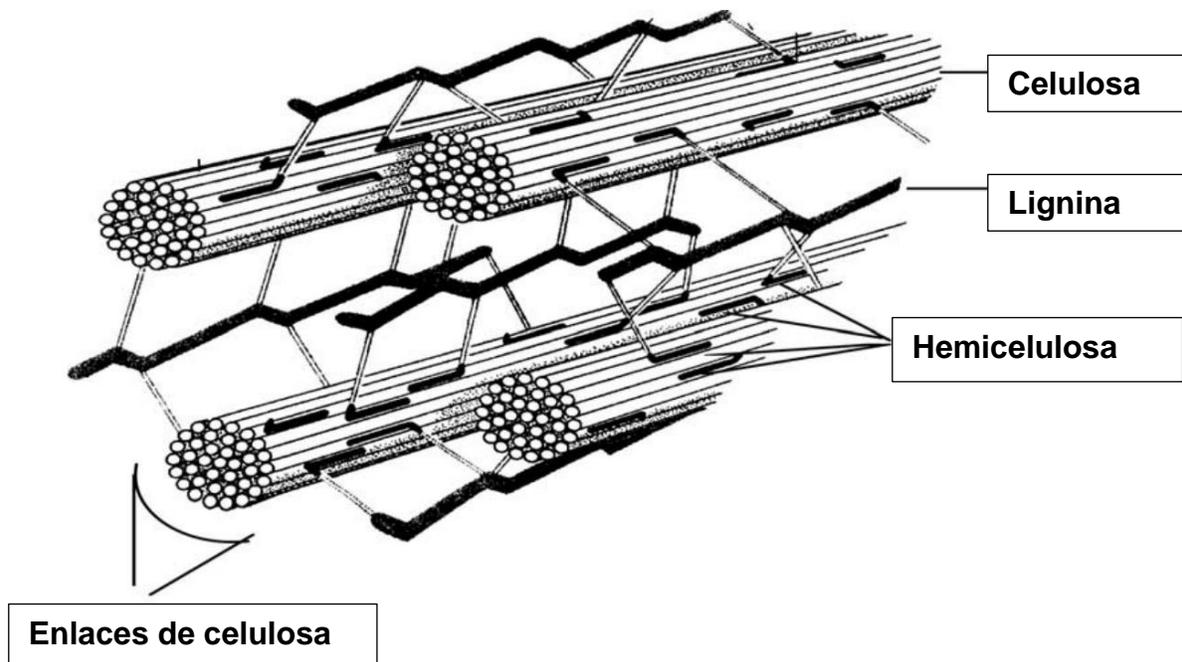
En las secciones siguientes se explica la composición de este tipo de materiales y sus limitaciones en su uso como materia prima para la recuperación y uso de azúcares en la producción de biocombustibles.

#### **1.1.1. Material lignocelulósico**

El material lignocelulósico es abundante en el planeta, y se puede clasificar en grupos dependiendo de su obtención: residuos agrícolas (bagazo, rastrojo, paja, semillas), maderas duras (álamo), maderas blandas (pinos), residuos de celulosa (papel para reciclar, periódicos), hierbas (heno, bambú, hierba, pastos altos, alpiste) y residuos sólidos municipales (Cardona et al., 2010). Una tonelada seca de material lignocelulósico, como bagazo el de caña, puede llegar a generar alrededor de 250 a 300 L de bioetanol (Sims et al., 2009; Gitifar et al., 2013; Lacerda, 2014; Arenas-Cárdenas et al., 2017).

La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas. Está integrada principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, cuya composición, dependiendo de su origen, es de 30-50% de celulosa, 15-35% de hemicelulosa y 15-25% de lignina, el porcentaje restante se compone de cenizas, proteínas y pectinas (Prinsen, 2010; Mood et al., 2013; Travaini et al., 2016b). Estos componentes se unen para formar la composición principal de la pared

celular de las plantas como se muestra en la Figura 1. La unión de estos componentes da como resultado una serie de redes de lignina-polisacáridos.



**Figura 1.** Esquema de la pared celular vegetal y sus componentes (Murphy y McCarthy, 2005)

La Tabla 1 presenta el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de diferentes tipos de materiales lignocelulósicos. El porcentaje de cada uno de los componentes (lignina, celulosa y hemicelulosa) sirve como referencia a la cantidad de azúcares complejos disponibles. Si el material presenta un porcentaje alto de celulosa, como es el caso del algodón o el papel, la cantidad de azúcares complejos libres obtenidos durante el proceso de fermentación será mayor a uno que presente porcentajes más bajos (Lacerda, 2014). El material que presente un porcentaje alto de lignina requerirá de mayor cantidad de energía para romper la estructura principal del material y permitir el acceso a los azúcares fermentables disponibles.

**Tabla 1.** Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en diferentes materiales en base seca (Sun y Cheng, 2002; Lacerda, 2014)

Material lignocelulósico	% Celulosa	% Hemicelulosa	% Lignina
<i>Algodón</i>	80-95	5-20	0
<i>Cáscara de nuez</i>	25-30	25-30	30-40
<i>Estiércol de ganado</i>	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
<i>Hojas</i>	15-20	80-85	0
<i>Madera dura</i>	40-55	24-40	18-25
<i>Madera suave</i>	45-50	25-35	25-35
<i>Mazorca de maíz</i>	45	35	15
<i>Paja de trigo</i>	30	50	15
<i>Papel</i>	85-99	0	0-15
<i>Papel periódico</i>	40-55	25-40	18-30
<i>Pasto de Bermuda</i>	25	35.7	6.4
<i>Pastos</i>	25-40	35-50	10-30
<i>Pastos de crecimiento rápido</i>	45	31.4	12
<i>Residuos clasificados</i>	60	20	20
<i>Residuos de pulpeo químico</i>	60-70	10-20	5-10

A continuación, se describen los tres principales componentes del material lignocelulósico y su papel dentro de la pared celular.

### Lignina

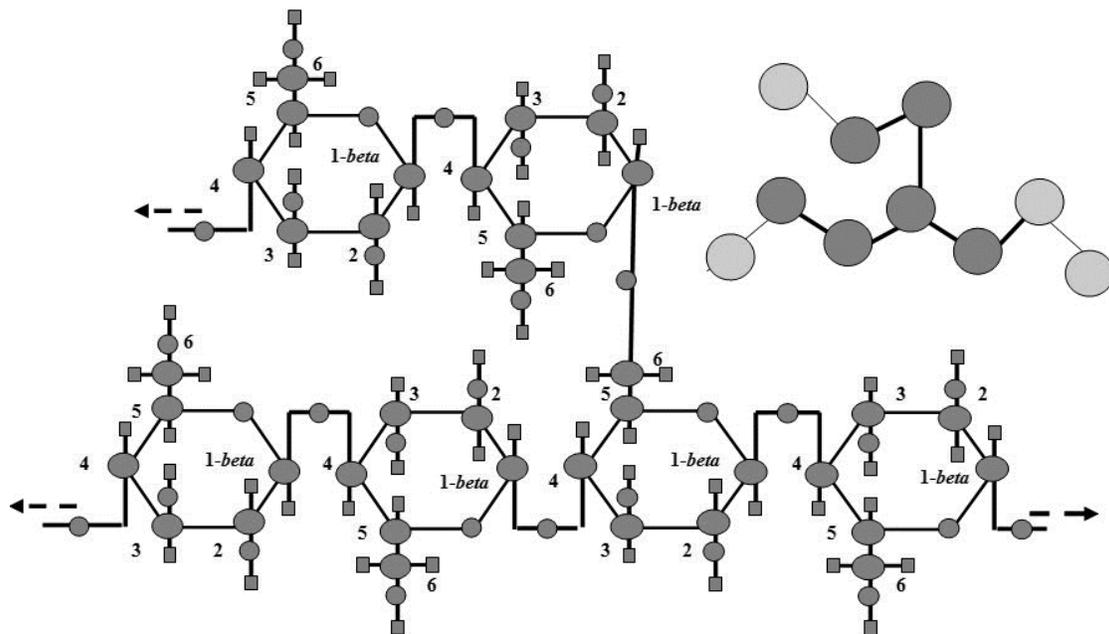
La lignina constituye alrededor del 15 al 25% de la composición de la pared celular vegetal (Sun y Cheng, 2002). Es un heteropolímero<sup>a</sup> amorfo y ramificado, formado por alcoholes aromáticos los cuales proveen soporte estructural, rigidez y protección a la pared celular, aportando un carácter recalcitrante con los otros compuestos (celulosa y hemicelulosa) (Cuervo et al., 2009). Estas ramificaciones presentan una estructura tridimensional irregular debido a que los enlaces que la conforman no se repiten con frecuencia (Prinsen, 2010). Los monómeros principales de la lignina se forman mediante un proceso de polimerización que empieza en el citoplasma recorriendo el camino hacia la pared de la célula durante el proceso de fotosíntesis de las plantas (Li y Chapple, 2010). Comienza con la desaminación de la fenilalanina de las plantas, lo cual da lugar a una serie de

<sup>a</sup> Polímero proveniente de diferentes tipos de monómeros.

reacciones de metilación e hidroxilación que modifican los anillos aromáticos reduciendo su cadena lateral acida a un alcohol. Esto da como resultado la producción de los monolignoles principales: alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico. Después de incorporarse al polímero de lignina se conocen como unidades de cumaril o *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) y siringil (S) (Prinsen, 2010). La lignina se clasifica como soluble e insoluble; la lignina soluble no presenta una estructura definida, facilitando el acceso a los azúcares; la lignina insoluble presenta una estructura definida aportando el carácter recalcitrante al material (Chávez-Sifontes y Domine, 2013; Arenas-Cárdenas et al., 2017).

### Hemicelulosa

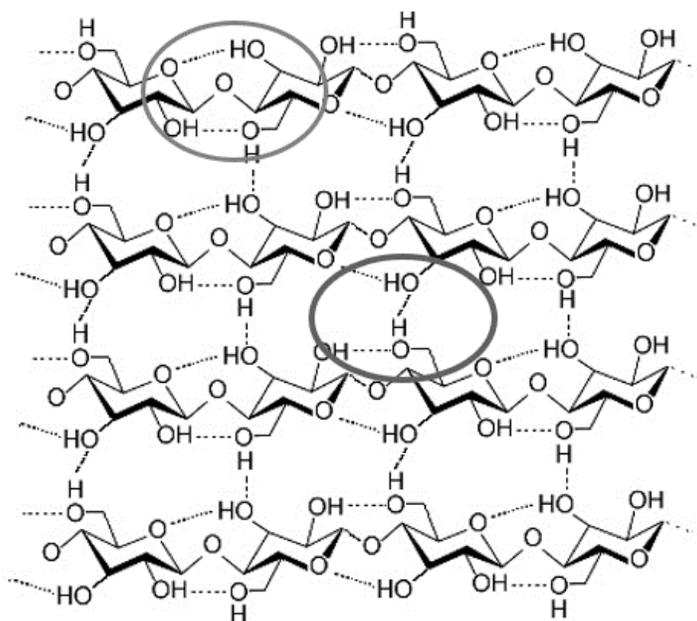
La hemicelulosa es un polisacárido heterogéneo, compuesto por una combinación de pentosas (xilosas y arabinosas) y hexosas (manosa, galactosa y glucosa) (Prinsen, 2010; Abreu-Sherrer, 2013) unidas mediante enlaces éter (Figura 2). La hemicelulosa tiene un peso molecular menor al de la celulosa. La hemicelulosa forma enlaces covalentes con la lignina, recubriendo la celulosa, ayudando a mantener la flexibilidad y el soporte de la misma (Hendriks y Zeeman, 2009).



**Figura 2.** Estructura de la hemicelulosa (Pradera, 2016)

## Celulosa

La celulosa es el polímero natural más abundante de la Tierra, está integrado principalmente por cadenas de celobiosa (dímeros de glucosa) agrupados en microfibrillas unidos por enlaces covalentes y puentes de hidrógeno (Hendriks y Zeeman, 2009; Prinsen, 2010; Abreu-Sherrer, 2013). El arreglo de las microfibrillas presenta dos tipos de estructuras: amorfa y cristalina. La estructura cristalina es altamente resistente a las hidrólisis química y biológica, presenta cristalinidad dificultando la liberación de azúcares. La estructura amorfa es soluble y menos compacta, lo que facilita la liberación de azúcares (Abreu-Sherrer, 2013; Arenas-Cárdenas et al., 2017). El tipo de estructura que presenta la celulosa está relacionado con los enlaces de la matriz los cuales pueden ser intramoleculares e intermoleculares (Figura 3).



**Figura 3.** Estructura molecular de la celulosa, enlaces intramoleculares (óvalo inferior) e intermoleculares (óvalo superior). Adaptado de (Abreu-Sherrer, 2013)

### 1.1.2. Pretratamientos

Debido a la naturaleza recalcitrante de los materiales lignocelulósicos, y a la dificultad de poder usar los azúcares directamente en la producción de biocombustibles, es necesario aplicar un pretratamiento que permita aumentar la

recuperación de los polisacáridos contenidos en la matriz lignocelulósica. Los pretratamientos se clasifican en mecánicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos (Sun y Cheng, 2002; Kumar et al., 2009; Mood et al., 2013). El pretratamiento debe romper los puentes de hidrógeno entre las cadenas de celulosa, descomponer la lignina y parte de la hemicelulosa, evitar la formación de productos secundarios como ácidos carboxílicos y furfurales que pueden inhibir el proceso de fermentación de producción de biocombustibles. El proceso no debe disminuir la cantidad de azúcares fermentables disponibles en la materia prima y finalmente que el costo total no sea excesivo (Dubois et al., 1956; Mosier et al., 2005; Kumar et al., 2009; Kumar y Murthy, 2011).

El objetivo principal del pretratamiento es remover la lignina, reducir la cristalinidad de la celulosa e incrementar la porosidad del material lignocelulósico para facilitar el acceso de enzimas y microorganismos a los azúcares (Agbor et al., 2011). Independientemente del tipo de pretratamiento que se aplique, es necesario realizar un tratamiento físico de molienda al material lignocelulósico con el fin de incrementar la porosidad y área de transferencia del material para optimizar el tratamiento subsecuente (Kojima y Yoon, 2008).

#### **1.1.2.1. Pretratamientos físicos**

Este tipo de tratamiento permite aumentar el área superficial incrementando la porosidad del material al reducir el tamaño de partícula mediante la aplicación de un trabajo mecánico, ya sea molienda o triturado. Reduce la cristalinidad de la celulosa permitiendo que la transferencia de energía y masa durante la aplicación de otro pretratamiento incremente (Cuervo et al., 2009; Kumar et al., 2009; Abreu-Sherrer, 2013). El alto costo tanto energético, así como la imposibilidad de deslignificar la materia prima, afectando solo la estructura cristalina de la celulosa, hace que sea necesaria la aplicación de un pretratamiento adicional, para tener una alta eficiencia de recuperación de azúcares durante la etapa de hidrólisis y fermentación (Mood et al., 2013).

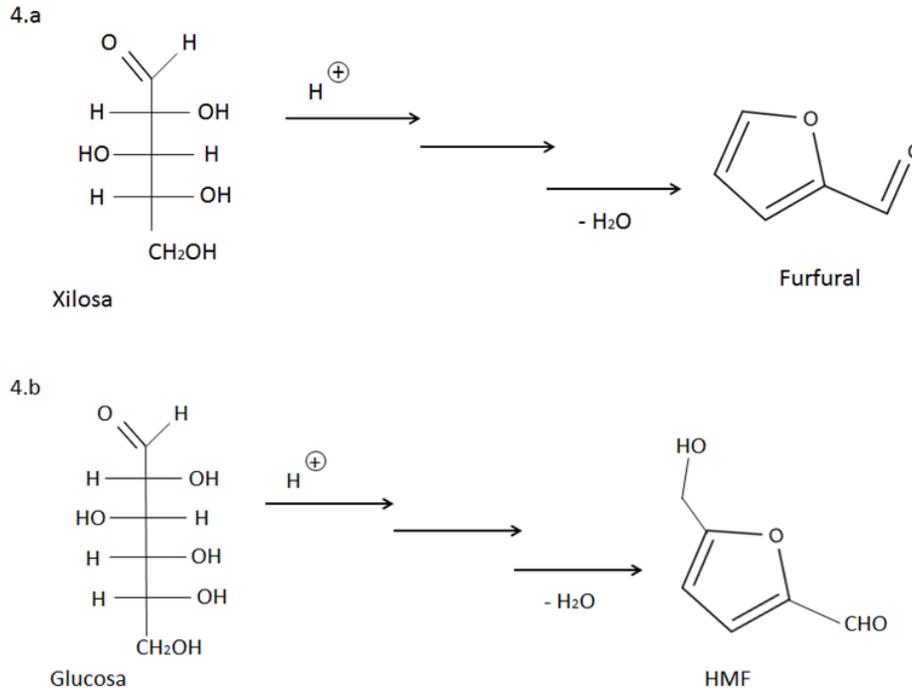
### 1.1.2.2. Pretratamientos fisicoquímicos

Este tipo de pretratamientos afectan directamente tanto la composición química del material como la física, esto se logra al modificar factores como la temperatura del material o la presión a la que éste será sometido, así como pH del mismo, generando una ruptura a nivel molecular. (Agbor et al., 2011).

#### *Explosión de vapor*

La explosión de vapor es el tratamiento más usado a nivel industrial (Kumar et al., 2009). El principio es disminuir de golpe la presión (de presión alta a una presión atmosférica) del sistema generando una carga de vapor, con el fin de romper la estructura de la lignina, dividiéndola en sus compuestos más simples a través de los enlaces de hidrógeno que se rompen entre la estructura polimérica de la lignina y la del vapor entrante. La biomasa se calienta rápidamente debido a la inyección del vapor saturado a alta presión, las temperaturas suelen ser de 160 a 260 °C, con una presión de 0.69 a 4.83 MPa (Kumar et al., 2009). Al ser un anfótero, el agua, a altas temperaturas inicia una reacción de hidrólisis entre la hemicelulosa y la lignina (Kumar et al., 2009; Agbor et al., 2011). La ruptura de dichos enlaces genera nuevos compuestos como son ácido carboxílico, fenol, furfural, entre otros. Debido a la liberación rápida de la presión, la biomasa presenta una descompresión, expandiéndose bruscamente.

Debido al uso de altas temperaturas, los enlaces anhidros presentes en la hemicelulosa y la celulosa se descomponen para formar otros compuestos como furfurales, hidroximetilfurfural (HMF) y ácido acético (Prinsen, 2010; Agbor et al., 2011). La Figura 4 muestra el mecanismo de formación del furfural en la molécula de xilosa (presente en la hemicelulosa) y de 5-hidroximetilfurfural a partir de la glucosa (presente principalmente en la celulosa) (Hu y Ragauskas, 2012).



**Figura 4.** *a)* Mecanismo de formación de furfural a partir de la xilosa. *b)* Mecanismo de formación de 5-hidroximetilfurfural (HMF) a partir de la glucosa. Adaptado de (Hu y Ragauskas, 2012)

#### Pretratamiento con agua líquida (LHW)

En este pretratamiento se utiliza agua en vez de vapor para elevar la temperatura del material. El agua a altas temperaturas (140-230 °C) actúa como un ácido débil, es necesario mantener la presión para que el agua no cambie de fase y con ello provocar alteraciones en el material lignocelulósico (Arenas-Cárdenas et al., 2017). El agua penetra en la biomasa hidratando la celulosa y solubilizando la hemicelulosa y removiendo la lignina causando despolimerización, ya que actúa de manera selectiva sobre los enlaces glucosídicos para formar ácido acético (Abreu-Sherrer, 2013), es por ello que es necesario ajustar un pH entre 4-6 para simular una reacción ácida que genera la despolimerización (Brandon et al., 2008). Este tipo de procesos se puede realizar con tres configuraciones las cuales depende de la dirección del flujo del agua a través de la biomasa: co-corriente, contra-corriente y flujo a través de la biomasa (Agbor et al., 2011; Arenas-Cárdenas et al., 2017).

### **1.1.2.3. Tratamientos biológicos**

Se asocia con la acción de microorganismos como hongos, que sean capaces de producir enzimas que degraden el material lignocelulósico (los tres compuestos principales), deslignificando parcialmente el material sin necesidad de aplicar una gran cantidad de energía e incrementando los azúcares fermentables (Kumar et al., 2009), a su vez incrementa la porosidad del residuo debido a la alta selectividad de degradación de lignina de los hongos (Binod et al., 2010). Microorganismos como hongos blancos, café y suaves se han estudiado para la degradación del material lignocelulósico. Se ha mostrado que los hongos café atacan principalmente a la celulosa, mientras que los blancos y los suaves tienen preferencia por la lignina y celulosa dada la facultad de generación de enzimas como lignina peroxidasa, oxidasa y lacasa que degradan específicamente a la lignina (Agbor et al., 2011). El ascomiceto *Trichoderma reesei* es el hongo más empleado para el proceso de pretratamiento debido a que este hongo filamentoso tiene altas actividades enzimáticas celulolíticas y xilanolíticas (Lee et al., 2008).

### **1.1.2.4. Pretratamientos químicos**

Afectan directamente la composición del material al someterse a una reacción química. A diferencia de los fisicoquímicos, en este tipo de tratamientos no se modifica ni la presión ni temperatura del medio de manera directa, solo se modifican las concentraciones de los reactivos como ácido sulfúrico o hidróxido de sodio (Kumar et al., 2009; Agbor et al., 2011; Abreu-Sherrer, 2013).

#### *Hidrólisis ácida*

Este tratamiento se realiza utilizando ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico o acético. La temperatura durante el proceso puede alcanzar intervalos de 140 a 210 °C con ácidos concentrados, mientras tanto se han registrado temperaturas menores a 120 °C con ácidos diluidos. La presión durante todo el tratamiento se mantiene a condiciones atmosféricas. El ácido a utilizar es mezclado con la biomasa para hidrolizar la hemicelulosa en xilosa y otros azúcares y la celulosa en glucosa, la reacción llega a continuar hasta romper la xilosa, en este caso la lignina presente

se precipitará en el ambiente ácido. Dependiendo de la temperatura del proceso, la degradación de la xilosa puede llegar a formar furfural y de la degradación de la glucosa generar hidroximetilfurfural (HMF), y compuestos aromáticos debido a los enlaces anhidros de la hemicelulosa (Prinsen, 2010), esto muestra una gran desventaja ya que estos compuestos son inhibidores biológicos.

### *Ozonación*

La reacción con ozono se realiza a presión y temperatura ambiente, promoviendo la degradación de la lignina presente en el material y exponiendo las fibras para obtener un mejor rendimiento de azúcares para la hidrólisis enzimática. El ozono puede reaccionar con la celulosa y la hemicelulosa, pero a menor velocidad que con la lignina; la reacción ozono-lignina es aproximadamente  $10^6$  veces más rápida que la de ozono-celulosa/hemicelulosa, ya que tiene preferencia a reaccionar con compuestos de alta densidad electrónica como los compuestos fenólicos, aromáticos y olefínicos (Travaini et al., 2016; Travaini y Barrado, 2016; Arenas-Cárdenas et al., 2017). El núcleo aromático de los compuestos fenólicos presentes en la lignina es altamente susceptible a reaccionar con el ozono haciendo una apertura en el anillo estructural generando moléculas de bajo peso molecular solubles en agua, evitando la formación de productos secundarios inhibidores como ácidos carboxílicos y furfurales (Kumar y Murthy, 2011; Arenas-Cárdenas et al., 2017). Esta reacción se conoce como ozonólisis. Los parámetros a considerar del pretratamiento para tener altos rendimientos de recuperación son, tamaño de partícula y humedad del material, flujo de ozono y tiempo de reacción (Travaini et al., 2016).

La Tabla 2 resume las condiciones de los pretratamientos físicos, químicos y biológicos, dependiendo del tipo de material y los rendimientos de glucosa en porcentaje peso/peso de cada pretratamiento. Se observa que el pretratamiento cumple con los objetivos de incrementar la disponibilidad de la glucosa del material.

**Tabla 2.** Rendimiento de carbohidratos de material lignocelulósico sometido a un pretratamiento y a una posterior hidrólisis enzimática

Tipo	Pretratamiento	Condiciones	Material	Rendimientos de carbohidratos %	Referencia
<i>Físicos</i>	Trituración	Combinación con otros pretratamientos	Paja de arroz	61.4	(Jin y Chen 2006)
<i>Físico-químicos</i>	Explosión de vapor	Presión: 0.8 MPa Humedad: 20%	Paja de trigo	75.34	(Zhang et al., 2008)
	Extracción con agua caliente (LHW)	T: 188 °C t: 40 min	Paja de trigo	43.6	(Perez et al., 2008)
<i>Químicos</i>	Hidrólisis ácida	Concentración H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : 60% (v/p) T: 50 °C, t: 120 min	Bagazo de caña	53.73	(Domínguez–Domínguez et al., 2012)
	Hidrólisis alcalina	Concentración NaOH: 2% (v/p) T: 121 °C, t: 30 min	Paja de trigo	87	(Mcintosh et al., 2011)
	Ozonación	Dosis O <sub>3</sub> : 2.7% (p/p) Humedad: 40% t 120min	Paja de trigo	50	García-Cubero et al., 2012
<i>Biológicos</i>	Hidrólisis enzimática	Enzima: <i>Irpex lacteus</i> CDC 2 T: 20 °C t: 120 días	Rastrojo de maíz	66.4	Xu et al., 2010

Cada pretratamiento actúa de manera diferente en el material, dependiendo de las condiciones de operación, y de la naturaleza del material, esto hace que los rendimientos sean diferentes. La Tabla 3 muestra las ventajas y desventajas principales de cada pretratamiento.

**Tabla 3. Ventajas y desventajas de diferentes pretratamientos (Kumar et al., 2009; Agbor et al., 2011)**

<b>Pretratamiento</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<i>Molienda</i>	Reducción de la cristalinidad de la celulosa	Alto consumo de energético para lograr tamaños pequeños
<i>Explosión de vapor</i>	Degradación de la hemicelulosa y lignina	Formación de inhibidores biológicos y degradación de xilosa. Altos costos de equipo
<i>Hidrotérmico (LHW)</i>	Solubiliza hemicelulosa	Altos costos de equipo
<i>Hidrólisis ácida</i>	Reduce el contenido de lignina con costos bajos	Generación de inhibidores
<i>Hidrólisis alcalina</i>	Remueve lignina y hemicelulosa	Generación de inhibidores y altos costos
<i>Ozonación</i>	Altas eficiencias en remoción de lignina. No genera inhibidores biológicos, tiempos cortos de reacción (en minutos)	Altas cantidades de ozono requerido. Costos elevados de equipos
<i>Biológicos</i>	Bajo requerimiento de energía. Degrada lignina	Tiempos de 13-15 días

## **1.2. Planteamiento del problema**

En la industria tequilera, para producir 1 L de tequila se generan alrededor de 10 a 12 L de vinazas y entre 1.5 y 2 kg de bagazo (Cámara Nacional de la Industria Tequilera, 2017). De acuerdo a la producción de tequila, en el año 2017 se generaron alrededor de 424 mil toneladas de bagazo de agave en el estado de Jalisco (Cámara Nacional de la Industria Tequilera, 2017). Si la disposición del bagazo no es adecuada, se convierte en un problema ambiental y económico; el bagazo se ha usado para composteo, alimento de ganado y combustión en calderas, sin embargo, por lo general se usan espacios que pudieran ser útiles para cultivos. Es importante entonces, brindar un valor agregado al bagazo de agave, y una alternativa es usarlo como materia prima para la producción de biocombustibles dada su composición rica en polisacáridos.

Como ya se explicó, debido a su composición fisicoquímica, este tipo de material lignocelulósico, se requiere de un pretratamiento que permita incrementar la biodisponibilidad de azúcares contenidos en el material para su uso en la producción de biocombustibles. Un pretratamiento es la ozonación; estudios han mostrado que el ozono tiene preferencia por reaccionar con la lignina sin reaccionar con la celulosa y hemicelulosa (Kojima y Yoon, 2008; García-Cubero et al., 2012; Travaini et al., 2016; Arenas-Cárdenas et al., 2017). Esta preferencia lo hace un tratamiento altamente viable ya que no degrada los azúcares reductores (glucosa y xilosa).

Por lo que es necesario optimizar los parámetros adecuados de la reacción entre el ozono y el bagazo de agave para evitar que los compuestos orgánicos presentes en la muestra se degraden junto con la lignina, con el fin de obtener altos rendimientos de conversión de azúcares y degradación de lignina.

## **1.3. Justificación**

La búsqueda de alternativas energéticas se ha vuelto prioritaria en el último siglo debido al agotamiento de las reservas de combustibles fósiles y al impacto ambiental que éstos tienen en el planeta. Los biocombustibles son opciones

atractivas como sustitutos para los combustibles fósiles o como aditivos para mejorar el rendimiento de los mismos. El uso de materiales renovables para la producción de biocombustibles es una ventaja con respecto a la producción de combustibles fósiles al darles un valor agregado, contribuyendo además a la reducción de la huella de carbono. En este trabajo se empleó el bagazo de agave, que es generado en la industria tequilera, como material potencial en la generación de biocombustibles, principalmente biogás (metano y/o hidrógeno). El uso del bagazo de agave en la generación de biocombustibles es una alternativa viable debido a su contenido de azúcares que pueden ser aprovechados (Ben'ko et al., 2013; Abreu-Sherrer, 2013; Lacerda, 2014).

El bagazo tiene un contenido energético que depende de su humedad, y va de 16203 a 18096 kJ/kg para el 50 a 0% de humedad (Garcés-Paz y Martínez-Silva, 2007; Zumalacarregui et al., 2008), equivalente a 4.5 y 5 kWh/kg, respectivamente (1 kWh = 3600 kJ), lo cual representa el potencial energético del bagazo si éste se quema y la combustión es eficiente. El contenido de energía total del metano a condiciones estándar de temperatura y presión es de 35.8 kJ/L. Considerando que se llegan a producir de 218 a 412 L de metano por kg de bagazo a condiciones estándar de temperatura y presión (Suacedo-Luna et al., 2010; Travaini et al., 2016), entonces, la energía que puede producirse a partir de 1 kg de bagazo es de 7804 a 14338 kJ/kg, equivalente a 2.2 a 4 kWh por kg. Los valores teóricos indican que el contenido energético es mayor si se quema el bagazo, sin embargo, durante la combustión se generan gases de efecto invernadero y partículas que contribuyen a la mala calidad del aire. Al emplear biocombustibles generados a partir del bagazo el impacto al ambiente es menor, además de contribuir con la búsqueda de fuentes alternativas de energía.

#### **1.4. Hipótesis**

El pretratamiento de bagazo de agave con ozono permite solubilizar la lignina y conservar los azúcares contenidos el material, celulosa (glucosa) y hemicelulosa

(xilosa). El pretratamiento con ozono tiene un efecto sobre la estructura química del bagazo de agave y en la liberación de azúcares.

## **1.5. Objetivos**

Objetivo general

Pretratar bagazo de agave con ozono para aumentar la disponibilidad de azúcares reductores, como glucosa y xilosa, en términos del tamaño de partícula y dosis de ozono.

Objetivos específicos

1. Implementar métodos analíticos para la caracterización del bagazo de agave.
2. Implementar el sistema de pretratamiento químico del bagazo de agave usando ozono.
3. Evaluar el pretratamiento del bagazo de agave usando ozono en función de la degradación de lignina y recuperación de azúcares, al variar el tamaño de partícula del bagazo y la dosis de ozono.

## **1.6. Fundamentos teóricos**

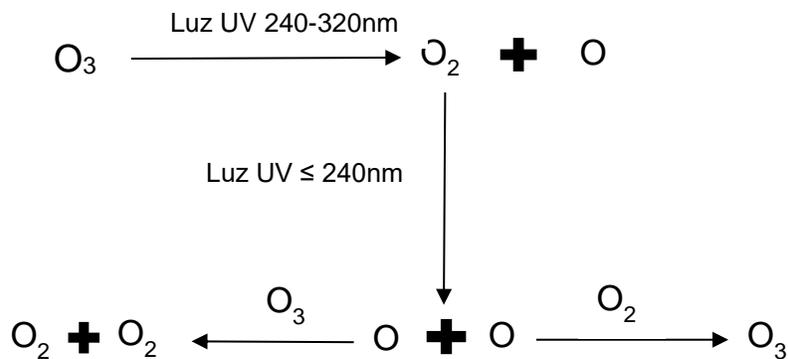
### Ozono

El ozono es un gas inestable que presenta un olor característico irritante, con una concentración en la atmósfera mayor a 0.25 mg/L; considerado peligroso para la salud (Arenas-Cárdenas, 2015). Debido a la gran capacidad oxidante y por la rapidez en que se disgrega su tercer átomo volviéndose oxígeno, es empleado para la desinfección de agua potable, el blanqueo de la pulpa del papel y la degradación de materia orgánica presente en las aguas residuales municipales (Gottschalk et al., 2010; Instituto del Agua y las Ciencias, 2013).

## Generación de ozono

Existen dos maneras de generar ozono: la generación natural (formación atmosférica) y la generación artificial (formación de ozono por medio de un arco eléctrico).

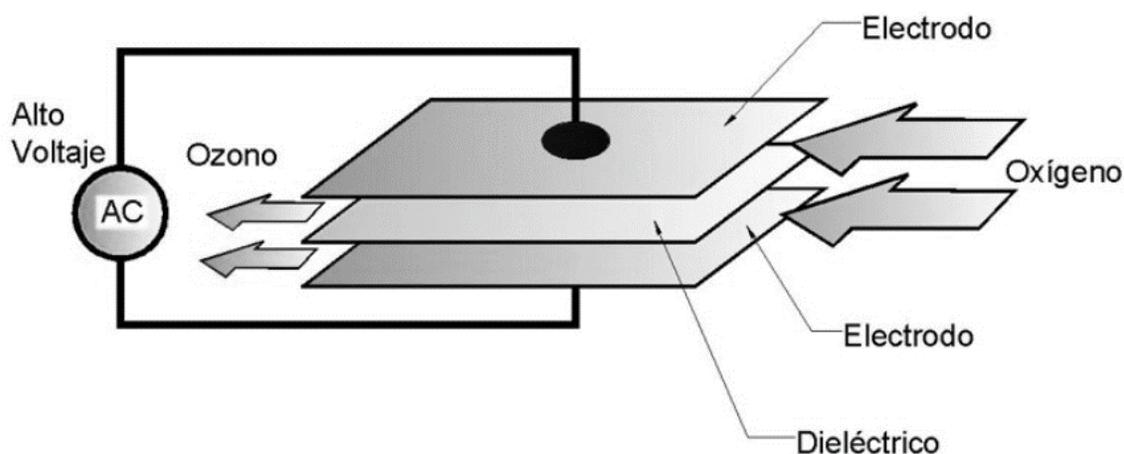
En la atmósfera la generación se inicia cuando las moléculas diatómicas de oxígeno se separan en átomos libres altamente reactivos debido a la acción de la radiación ultravioleta. Estos átomos luego colisionan con otras moléculas de oxígeno, dando como resultado moléculas de ozono (Parzanese, 2011). La Figura 5 muestra un diagrama general de las reacciones que suceden en la atmósfera para generar ozono. La luz UV en el intervalo de 240-320 nm destruye el  $O_3$  en  $O_2$  y  $O$ . El  $O_2$  puede descomponerse cuando la luz UV emite una frecuencia de onda menor a 240 nm, la molécula se descompone en dos átomos de oxígeno las cuales, o bien pueden reaccionar con  $O_2$  para formar  $O_3$  o con  $O_3$  para formar  $2O_2$  (Doadrio-Villarejo, 2013; Arenas-Cárdenas, 2015).



**Figura 5.** Sistema de reacción y ciclo de formación del ozono atmosférico (Doadrio-Villarejo, 2013).

Para la formación artificial, debido a la inestabilidad de la molécula, el ozono que se utiliza para procesos ya sea alimentarios, de sanitización o para tratamientos, se genera de manera *in situ* utilizando una corriente de oxígeno o aire. Cuando las moléculas de oxígeno en el gas de alimentación son expuestas a una descarga eléctrica controlada dentro del generador se produce una reacción que permite que el oxígeno molecular reaccione con un electrón. Durante la producción de

ozono, la descarga eléctrica produce una temperatura mayor a 50 °C por lo que se requiere un sistema de refrigeración que mantenga la temperatura dieléctrica constante garantizando de esta forma un flujo de ozono constante a la salida, la descarga de energía del arco eléctrico debe tener un alto diferencial de potencial (15 kV) y con una alta frecuencia de 50 Hz (Parzanese, 2011; Instituto del Agua y las Ciencias, 2013). La Figura 6 muestra un diagrama del flujo de oxígeno a través del arco eléctrico para la formación de ozono.



**Figura 6.** Diagrama del flujo de oxígeno para formar ozono a través de un arco eléctrico (*Instituto del agua y las Ciencias, 2013*)

#### Vías de reacción del ozono

El ozono puede reaccionar por dos vías con la materia: la vía molecular (directa) y la radical ( $\cdot OH$ ) (indirecta) como se muestra en la Figura 7.

La vía molecular consiste en la reacción directa de la molécula de ozono con la materia orgánica, esta vía es altamente selectiva con moléculas orgánicas que presentan dobles o triples enlaces y anillos aromáticos (Arenas-Cárdenas, 2015).

En la vía radical, el ozono oxida la materia a través de los radicales libres  $\cdot OH$ , que se generan cuando el ozono se descompone en agua o en agua con materia orgánica. A diferencia de la vía molecular, esta vía no es selectiva, ataca de forma indistinta a los diferentes compuestos orgánicos presentes y es favorecida a pH alcalinos (Henriksen y Svendby, 2009; Doadrio-Villarejo, 2013). Ambos

mecanismos actúan de manera diferente y dependen del pH del medio. Para favorecer la vía molecular se usa un pH menor a 7 mientras que para la vía radical el pH debe ser alcalino (Beltrán, 2003).



**Figura 7.** Diagrama general del sistema de reacción del ozono por ambas vías (Arenas-Cárdenas, 2015)

### Ozonación como pretratamiento para el material lignocelulósico

El ozono ha sido utilizado para degradar la lignina presente en los materiales lignocelulósicos sin afectar significativamente a la celulosa y hemicelulosa. La reacción principal entre el ozono y la lignina se debe a que el núcleo aromático de los compuestos fenólicos presentes en la lignina es altamente susceptible a reaccionar con el ozono provocando la apertura del anillo estructural (Arenas-Cárdenas, 2015; Travaini et al., 2016a; 2016b). Para que el pretratamiento con ozono sea eficiente es necesario considerar los siguientes factores: tiempo de reacción, flujo de ozono, concentración de ozono, humedad del material y tamaño de partícula del material (Gitifar et al., 2013).

La humedad crea un medio de reacción en donde el ozono en forma gaseosa se disuelve con el agua contenida en la muestra pasando y reaccionando con mayor facilidad debido a la formación de enlaces de hidrógeno entre el agua y los grupos carboxilo y carbonilo presentes en los compuestos poliméricos. Esta reacción genera una separación en las fibras de la lignina favoreciendo el incremento de la porosidad del material aumentando el área superficial del material (Mamleeva et al., 2009; Ben'ko et al., 2013; Travaini et al., 2013; Arenas-Cárdenas, 2015). El intervalo de humedad va de 25 a 70% en materiales como bagazo de caña (Neely,

1984; Kojima y Yoon, 2008; García-Cubero et al., 2012; Arenas-Cárdenas, 2015; Travaini et al., 2013; 2016a; 2016b).

El factor que determina el tamaño óptimo de partícula es la cantidad de energía requerida para la reacción (0.3 a 1.5 cm), la humedad en la muestra y el tiempo de reacción. A menor tamaño de partícula, el área de contacto entre el material y el ozono incrementará mejorando los rendimientos de recuperación de glucosa (celulosa) y xilosa (hemicelulosa). Esto se debe a los principios de transferencia convectiva y difusiva del ozono debido al movimiento global del fluido (Arenas-Cárdenas, 2015).

La Tabla 4 muestra un resumen del pretratamiento de material lignocelulósico con ozono a diferentes condiciones. La viabilidad del tratamiento se puede explicar tomando como ejemplo el caso de Arenas-Cárdenas (2015) que evaluó el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar con un tamaño de partícula de 0.7 mm, humedad del 40%, flujo de ozono de 0.8 g O<sub>3</sub>/h y 15 minutos de reacción, obteniendo los rendimientos del 82% para glucosa y 45% para xilosa, después de la hidrólisis enzimática. Con esta información se planteó la metodología para evaluar el pretratamiento con ozono del bagazo de agave.

**Tabla 4.** Rendimientos de azúcares después del pretratamiento con ozono e hidrólisis enzimática.

Parámetro	Material lignocelulósico		
	Paja de trigo	Bagazo de caña	
<i>Humedad (% p/p)</i>	20	40	40
<i>Tamaño de partícula (mm)</i>	<1	0.7	3-5
<i>Ozono</i>	2.7% O <sub>3</sub> (p/p)	1.8 g O <sub>3</sub> /h	3.44% O <sub>3</sub> p/p
<i>Tiempo de reacción (min)</i>	120	15	60
<i>Celulosa (% p/p)</i>	73.8	86.92	92.5
<i>Hemicelulosa (% p/p)</i>	72.6	82.01	86.8
<i>LIA (% p/p)</i>	34	64**	66.8**
<i>Referencia</i>	García-Cubero et al., 2012	Arenas-Cárdenas, 2015	Travaini et al., 2013

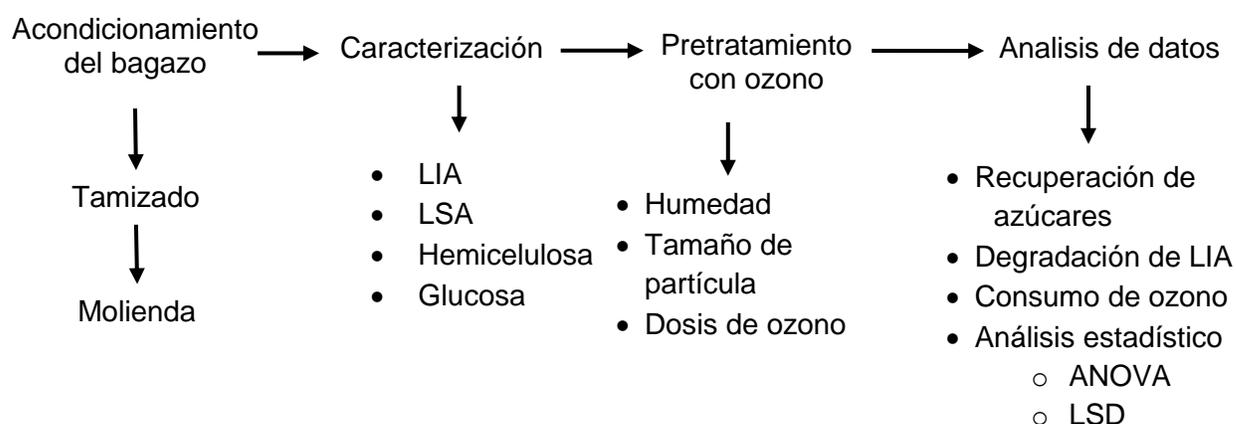
LIA: lignina ácida insoluble total después del pretratamiento. \*\*% de reducción de lignina con respecto a la total inicial.



## **2. Metodología**



La Figura 8 muestra un esquema de la metodología seguida en este trabajo para el pretratamiento de bagazo de agave con ozono. La metodología se dividió en cuatro etapas: la primera consistió en el acondicionamiento del bagazo de agave sin pretratar (tamaño de partícula y humedad); la segunda etapa se realizó la caracterización del material; posteriormente se realizó el pretratamiento usando ozono de acuerdo al diseño experimental planeado. El pretratamiento se evaluó a partir de la recuperación de azúcares, la degradación de lignina y con la cantidad de ozono consumido durante el proceso y se realizó un ANOVA.



**Figura 8.** *Esquema de metodología*

## 2.1. Acondicionamiento de la muestra

El bagazo de agave fue recolectado en una tequilera del estado de Jalisco; se secó durante 48 h a una temperatura de  $30 \pm 5$  °C. Una vez que se secó, se trituró con un molino de martillos y se seleccionaron los tamaños de partícula utilizando tamices con los números de malla 30, 24, 20 y 18 (basados en el estándar test de tamices de USA), para obtener tamaños de 600, 850 y 1200  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Una vez tamizado, el bagazo se almacenó en bolsas selladas a temperatura ambiente y en un lugar seco, evitando la presencia de luz solar.

## **2.2. Caracterización del bagazo de agave**

### *Determinación de lignina, hemicelulosa y celulosa*

La determinación de la lignina y carbohidratos estructurales (hemicelulosa como xilosa y celulosa como glucosa) se realizó de acuerdo a la metodología analítica del NREL (National Renewable Energy Laboratory, por sus siglas en inglés) (Sluiter et al., 2011). La lignina y carbohidratos estructurales constituyen una parte importante de las muestras de biomasa, este procedimiento se basa en una hidrólisis ácida para fraccionar la biomasa en compuestos fácilmente cuantificables. La lignina se fracciona en lignina insoluble ácida (LIA), la cual se cuantifica por gravimetría, y en lignina soluble ácida (LSA), la cual se determina por medio de espectroscopia UV. Tanto la lignina soluble como la insoluble se determinan para evaluar la efectividad del tratamiento.

Los carbohidratos poliméricos son hidrolizados a formas monoméricas solubles, y posteriormente son cuantificados por cromatografía líquida (HPLC). La descripción detallada de la metodología se encuentra en el Anexo A. Cada caracterización se realizó por triplicado.

## **2.3. Pretratamiento con ozono**

El pretratamiento del bagazo de agave con ozono se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por León-Becerril y López-López (2015).

### a) Humidificación de la muestra

El contenido de humedad del bagazo de agave se fijó en 45% (p/p), la muestra se mezcló manualmente para asegurar que la humedad fuera homogénea y sin grumos. La muestra se almacenó durante 24 h antes del pretratamiento con ozono.

## Implementación del sistema experimental

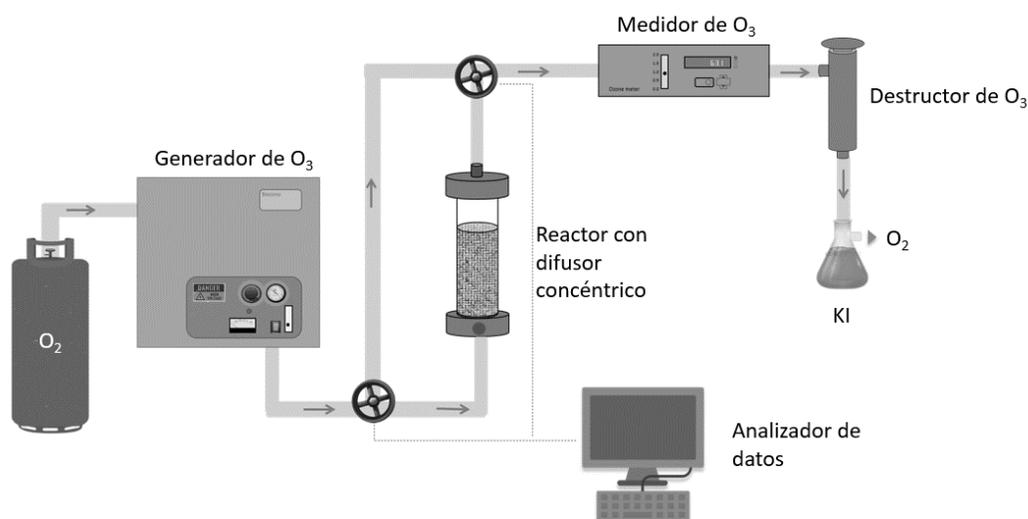
### a) Reactor

Para el pretratamiento se utilizó un reactor tubular de vidrio con un diámetro de 8.10 cm y altura de 42 cm. En el centro del reactor, está colocado un difusor tubular que permite que el ozono sea distribuido uniformemente a lo largo del reactor. Por la parte inferior se alimentó el ozono generado a partir de oxígeno, y por la parte superior se colocó una válvula que permitió su salida. El reactor tiene una capacidad de tratar hasta 60 g de bagazo de agave húmedo. La muestra de bagazo alimentada al reactor se distribuyó de manera homogénea.

Después del pretratamiento, el bagazo se secó en la estufa durante 2 días hasta que alcanzar una humedad del 4-6% y se almacenó en un lugar seco. Posteriormente se procedió a la caracterización del bagazo.

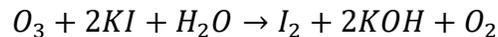
### b) Sistema de ozonación

El sistema de ozonación consistió en un generador de ozono, un destructor y un medidor de ozono, dos electroválvulas de control (una dirige flujo al medidor y la otra al reactor) y un programa para controlar las electroválvulas del sistema (Figura 9).



**Figura 9.** Diagrama del sistema de ozonación

Antes de conectar el reactor al sistema, es necesario encender el destructor de ozono y el medidor de ozono en fase gas, modelo 465H marca Teledyne y revisar que no haya fugas en el sistema. El medidor de ozono permitió controlar la concentración de ozono, así como llevar un registro del ozono a la salida del reactor y poder determinar el ozono consumido. A la salida del destructor, se colocó una trampa de yoduro de potasio para convertir el ozono residual en O<sub>2</sub>:



c) Condiciones de operación

El contenido de humedad del bagazo de agave se mantuvo constante y fue fijado en 45% p/p. Las dosis de ozono se fijaron en 60, 90 y 120 mg O<sub>3</sub>/g<sub>bag</sub>, y estuvieron en función de la concentración de ozono (mg/L), flujo volumétrico (L/min), tiempo de reacción y cantidad de bagazo usado. El flujo de ozono utilizado fue de 1.44 L/min, concentración de 60 a 63 mg/L y tiempos de reacción de 45, 65 y 85 min, respectivamente para una carga de bagazo de 60 g.

## 2.4. Análisis de datos

### *Consumo de ozono*

El consumo de ozono durante la reacción con el bagazo de agave se determinó como la diferencia entre las concentraciones del ozono alimentado al reactor y el ozono residual (aquel que no reaccionó con el bagazo) registradas en el analizador de ozono en fase gas. El porcentaje de consumo de ozono se calculó a partir de la Ecuación 1.

$$\% O_3 \text{ consumo} = \frac{O_3 \text{ inicial} - O_3 \text{ salida del reactor}}{O_3 \text{ inicial}} * 100$$

*Ecuación 1*

El porcentaje de ozono residual (% O<sub>3residual</sub>) durante el tratamiento se determinó como:

$$\% O_3 \text{ residual} = 100 - \% O_3 \text{ consumo}$$

*Ecuación 2*

### *Evaluación del pretratamiento*

El contenido de LIA, LSA, hemicelulosa y celulosa del bagazo de agave antes y después del pretratamiento con ozono se analizó para determinar la recuperación de azúcares y el incremento en la lignina soluble (LSA) y la degradación de la lignina insoluble (LIA), de acuerdo a las siguientes ecuaciones.

$$\% \text{ degradación LIA} = \left(1 - \frac{LIA}{LIA_0}\right) * 100$$

*Ecuación 3*

$$\% \text{ incremento LSA} = \left(\frac{LSA - LSA_0}{LSA_0}\right) * 100$$

*Ecuación 4*

$$\% \text{ recuperación } X = \left(\frac{X}{X_0}\right) * 100$$

*Ecuación 5*

Donde X puede ser celulosa o hemicelulosa.

## **2.5. Diseño experimental estadístico**

La Tabla 5 muestra el diseño experimental considerando tres tamaños de partícula y tres dosis de ozono, fijando el contenido de humedad en el material. Los experimentos se realizaron por triplicado.

**Tabla 5.** *Diseño experimental para análisis considerando el contenido de humedad constante a 45 % p/p*

<b>Tamaño de partícula (µm)</b>	600	850	1200
<b>Dosis de ozono (mg O<sub>3</sub>/g<sub>bag</sub>)</b>	60	90	120

Se evaluó el efecto de estos factores sobre las variables de respuesta recuperación de azúcares, la reducción de lignina insoluble, el incremento de lignina soluble y el consumo de ozono con un diseño multifactorial 3x3, con un total de 9 corridas experimentales. Se realizó un ANOVA que permitió evaluar el efecto principal y de interacción de cada uno de los factores, un análisis LSD de grupos homogéneos y la superficie de respuesta correspondiente. Para dichos análisis se utilizó el programa *Statgraphics centurion XVI*.

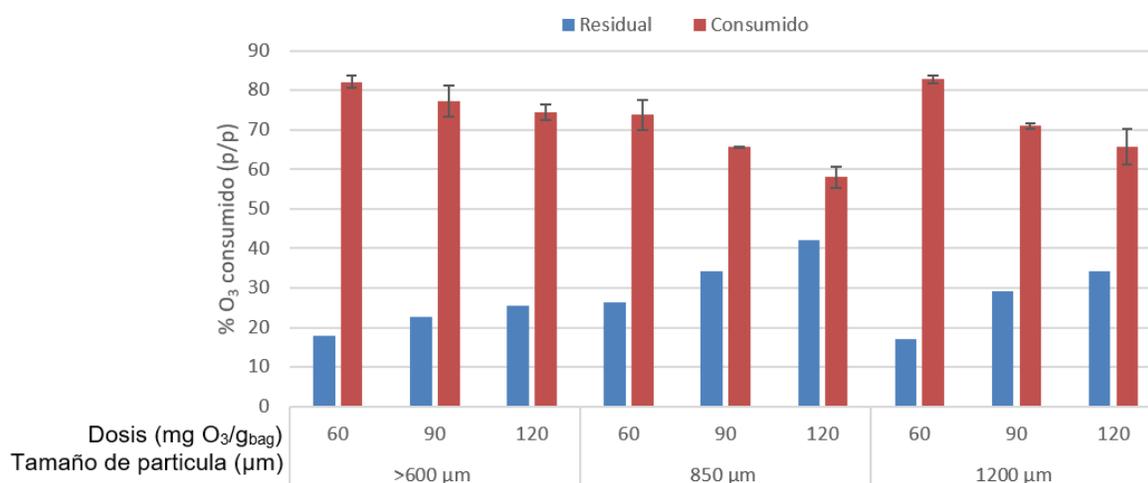
### **3. Resultados y análisis**

En esta sección se presentan y se discuten los resultados obtenidos. Primero, se presentan los resultados del consumo de ozono de la reacción con el bagazo de agave, enseguida la evaluación del pretratamiento del bagazo en función de la degradación de lignina y de la recuperación del contenido de azúcares (celulosa y hemicelulosa) del material. Finalmente, se presentan los resultados de la optimización del pretratamiento.

### 3.1. Consumo de ozono durante el pretratamiento

El consumo de ozono depende directamente de las condiciones del pretratamiento como la dosis de ozono y el tamaño de partícula. El consumo de ozono disminuyó cuando la dosis y el tamaño de partícula aumentaron; esto se debe a que un tamaño de partícula mayor implica una menor área disponible para reaccionar con el ozono. Cuando el tamaño de partícula disminuye, el área superficial de contacto del ozono con el material aumenta, favoreciendo la difusión del ozono en los intersticios del material.

La Figura 10 muestra los porcentajes de ozono consumido y residual en los pretratamientos con su respectiva desviación estándar.

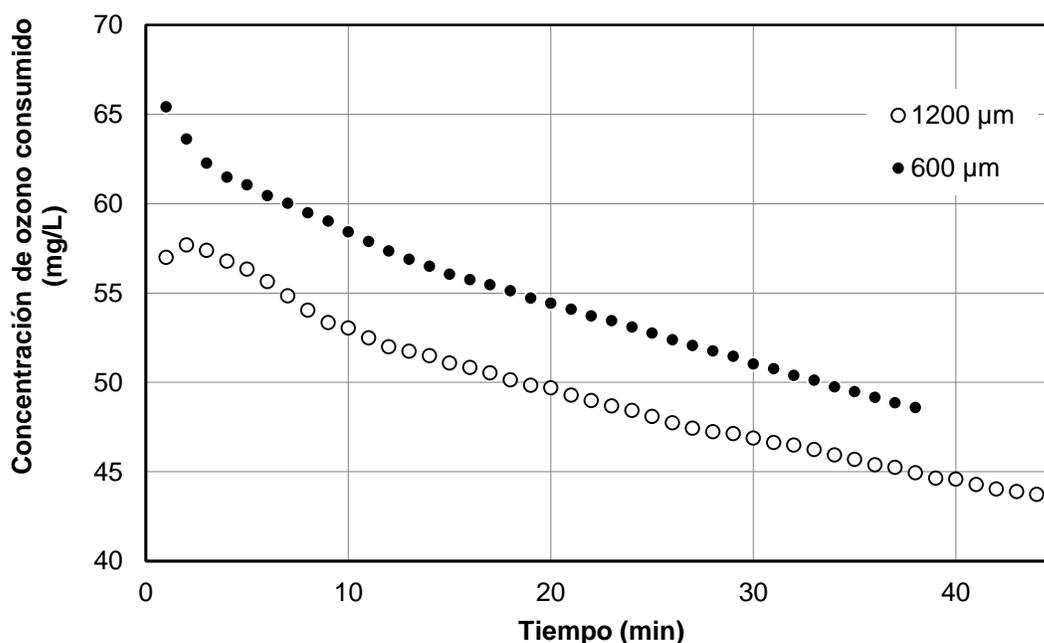


**Figura 10.** Ozono residual y consumido en el pretratamiento

El mayor consumo de ozono se obtuvo para la dosis de ozono de 60 mg O<sub>3</sub>/g<sub>bag</sub> y tamaños de partícula de 600 y 1200 μm, con 82 y 81%, respectivamente. Mientras

que para un tamaño de partícula de 850  $\mu\text{m}$ , el ozono residual es mayor conforme la dosis aumenta de 60 a 120  $\text{mg O}_3/\text{g}_{\text{bag}}$ , siendo este del 42%, es decir, el ozono alimentado solo fue consumido en un 58%.

La Figura 11 muestra el consumo de ozono en función del tiempo para los tamaños de partícula de 600 y 1200  $\mu\text{m}$  y una dosis de ozono de 60  $\text{mg O}_3/\text{g}_{\text{bag}}$ . Se observa que el consumo de ozono es más rápido en los primeros 10 minutos, y posteriormente sigue una tendencia lineal.



**Figura 11.** Consumo de ozono en el reactor, dosis de 60  $\text{mg O}_3/\text{g}_{\text{bag}}$ , tamaño de partícula de 600 y 1200  $\mu\text{m}$ .

El consumo de ozono para los 3 tamaños de partícula es mayor cuando se utiliza la dosis de ozono más baja, el consumo disminuye conforme la dosis de ozono aumenta. Incrementar la dosis de ozono implica incrementar el tiempo de reacción y que se pudieran degradar los azúcares presentes en el material, así como elevar los costos del proceso.

### 3.2. Evaluación del pretratamiento del bagazo de agave con ozono

La Tabla 6 muestra los resultados de la caracterización del bagazo sin tratar, éste presenta un contenido de lignina total del 27.84% p/p, celulosa del 43.7% p/p y hemicelulosa del 19.45% p/p. Los valores son similares con lo reportado en la literatura, y las pequeñas diferencias encontradas se deben a la especie de bagazo y al mismo proceso de cocción de las piñas de agave en la producción de tequila.

**Tabla 6.** Composición de bagazo de caña y agave (% p/p).

Material	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Referencia
<i>Bagazo de caña**</i>	39.1	22.5	23.1	Prinsen (2010)
	43	19	15	Montiel-Corona y Razo-Flores (2018)
	41.9**	12.1**	7.2	González-García et al. (2005)
<i>Bagazo de agave</i>	45.6	19.9	19.3	Perez-Pimienta et al. (2015)
	42	20	15	Suacedo-Luna et al. (2010)
	<b>43.7</b>	<b>19.45</b>	<b>27.84</b>	<b>Trabajo presente</b>

\*\*resultados reportados en base seca

La Tabla 7 presenta los resultados de la caracterización del bagazo de agave después del pretratamiento con ozono (promedio de tres corridas para cada tratamiento).

**Tabla 7.** *Composición del bagazo de agave después del pretratamiento usando ozono.*

Tamaño partícula (µm)	Dosis (mg O <sub>3</sub> /g <sub>bag</sub> )	LIA (%)	LSA (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	HMF (mg/g <sub>bag</sub> )	Furfural (mg/g <sub>bag</sub> )	Ácido acético (mg/g <sub>bag</sub> )
600	60	16.51 ± 0.35	10.07 ± 0.07	37.95 ± 2.09	14.21 ± 2.52	0.19	0.36	0.11
	90	15.83 ± 0.004	9.94 ± 0.004	31.94 ± 0.01	11.71 ± 0.002	< 0.01	0.06	0.12
	120	16.19 ± 0.003	9.74 ± 0.005	32.54 ± 0.04	11.98 ± 0.005	0.05	0.40	0.21
850	60	17.26 ± 0.24	8.9 ± 0.58	39.93 ± 1.42	17.63 ± 1.17	< 0.01	< 0.01	0.20
	90	16.01 ± 1.89	9.59 ± 0.18	35.48 ± 0.49	15.86 ± 0.07	< 0.01	0.41	0.24
	120	15.04 ± 0.21	9.54 ± 0.27	35.97 ± 0.00	16.58 ± 1.56	< 0.01	< 0.01	0.20
1200	60	16.6 ± 1.09	10.02 ± 0.33	37.39 ± 1.84	16.46 ± 0.24	< 0.01	< 0.01	< 0.01
	90	16.54 ± 2.22	9.93 ± 0.36	39.1 ± 1.18	15.88 ± 0.81	< 0.01	< 0.01	< 0.01
	120	15.72 ± 0.77	10.2 ± 0.67	30.95 ± 1.22	13.63 ± 0.62	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Sin pretratamiento		20.32 ± 0.44	7.52 ± 0.26	43.7 ± 1.41	19.45 ± 1.25	-----	-----	-----

El bagazo sin pretratar presenta una composición en base seca de  $7.52\% \pm 0.26$  de LSA y  $20.32\% \pm 0.44$  de LIA, sin presencia de furfurales o ácidos orgánicos. Se observa que para la menor dosis de ozono aplicada,  $60 \text{ mg O}_3/\text{g}_{\text{bag}}$ , el contenido de celulosa y hemicelulosa disminuyen en menor proporción que con dosis de ozono mayores.

La generación de inhibidores para todas las condiciones de operación fue baja, las máximas concentraciones encontradas fueron de  $0.41 \text{ mg/g}_{\text{bag}}$  ( $1.42 \text{ mg/L}$ ) para furfural con un tamaño de partícula de  $850 \mu\text{m}$  y una dosis de  $90 \text{ mg O}_3/\text{g}_{\text{bag}}$ . La cantidad de ácido acético fue menor a  $0.3 \text{ mg/g}_{\text{bag}}$  ( $83.4 \text{ mg/L}$ ) para todas las condiciones de operación. Sin embargo, esta concentración es menor a la reportada Jiang et al. (2013) para hidrólisis ácida, de  $0.3$  a  $0.5 \text{ g/L}$ . Akobi et al., (2016) determinaron que una concentración mayor de  $1 \text{ g/L}$  aproximadamente de furfural inhibe el proceso de fermentación para la producción de hidrógeno.

La Tabla 8 presenta la evaluación del pretratamiento del bagazo con ozono en función de la recuperación de azúcares, disminución de LIA y aumento de LSA. La LIA disminuyó para las distintas condiciones de pretratamiento, mientras que la LSA incrementó. La recuperación de celulosa y hemicelulosa fue al menos del  $70\%$  y  $60\%$ , respectivamente.

Para una dosis de ozono de  $90 \text{ mg O}_3/\text{g}_{\text{bag}}$  con un tamaño de partícula  $600 \mu\text{m}$  se obtuvo una degradación de LIA de  $22.10\%$ , y un incremento de LSA de  $32.21\%$ , con recuperaciones de celulosa y hemicelulosa del  $73.09\%$  y  $60.21\%$ , respectivamente. Mientras que para una dosis de ozono de  $90 \text{ mg O}_3/\text{g}_{\text{bag}}$  con un tamaño de partícula  $850 \mu\text{m}$  se obtuvo una degradación de LIA del  $21.21\%$ , con un incremento de LSA del  $27.54\%$  y recuperaciones de celulosa y hemicelulosa del  $81.19\%$  y  $81.49\%$  respectivamente.

**Tabla 8. Recuperación de azúcares y degradación de lignina**

Tamaño de partícula (µm)	Dosis de ozono (mg O <sub>3</sub> /g <sub>bag</sub> )	Recuperación celulosa (%)	Recuperación hemicelulosa (%)	Degradación LIA (%)	Aumento LSA (%)
600	60	86.84	73.06	18.75	33.91
	90	73.09	60.21	22.10	32.21
	120	74.46	61.59	20.31	29.53
850	60	91.37	90.59	15.06	18.35
	90	81.19	81.49	21.21	27.54
	120	82.31	85.23	25.98	26.86
1200	60	85.56	84.63	18.31	33.24
	90	89.48	81.65	18.60	32.05
	120	70.82	70.08	22.64	35.64

De los tratamientos evaluados, la recuperación más alta de celulosa y hemicelulosa fue del 91.37% y 90.59%, respectivamente a una dosis de 60 mg O<sub>3</sub>/g<sub>bag</sub>, para un tamaño de partícula de 850 µm, con una degradación de LIA del 15.06% y un incremento de LSA del 18.35%.

En los tres tamaños de partícula, la máxima recuperación de azúcares se obtuvo con las dosis de ozono más bajas, lo cual demuestra que, en concentraciones excesivas, el ozono puede reaccionar sobre los carbohidratos estructurales (Travaini et al., 2013). Si las dosis se incrementan, aumenta también el tiempo de reacción entre el ozono y el bagazo de agave, lo que implica que el ozono continúe con la degradación de los azúcares (Mamleeva et al., 2009; Ben'ko et al., 2013; Travaini et al., 2013).

La Tabla 9 muestra que los mejores resultados obtenidos fueron similares a los que se reportan en la literatura en cuanto a recuperación de azúcares (en un intervalo entre 80-90%), para un material similar y usando ozono como pretratamiento. Travaini et al. (2013) alcanzaron una degradación de lignina del 67%, mientras que en este trabajo se logró el 25.98%.

**Tabla 9.** Caracterización de material lignocelulósico pretratado con ozono

Parámetro	Residuo lignocelulósico			
	<i>Paja de trigo</i>	<i>Bagazo de caña</i>		<i>Bagazo de agave</i>
Humedad (% p/p)	20	40	40	-
Tamaño partícula (mm)	<1	0.7	3-5	0.85
Dosis de ozono (mgO <sub>3</sub> /g <sub>bag</sub> )	27	90	210	60
Tiempo de reacción (min)	120	15	60	45
Celulosa (% p/p)	73.8	86	92.5	91.37
Hemicelulosa (% p/p)	72.6	82	86.8	90.59
Degradación de lignina (% p/p)	34**	64	66.8	15.06
Referencia	García-Cubero et al., 2012	Arenas-Cárdenas, 2015	Travaini et al., 2013	Mejor resultado del presente estudio

\*\*% de lignina total

### 3.3. Optimización estadística

Se identificaron los principales factores con mayor influencia en las variables de respuesta para la optimización del pretratamiento con ozono para incrementar la disponibilidad de los azúcares presentes en el bagazo de agave. El ANOVA permitió determinar que los factores de tamaño de partícula y dosis de ozono no tienen un efecto estadístico sobre los porcentajes de LSA, celulosa y hemicelulosa.

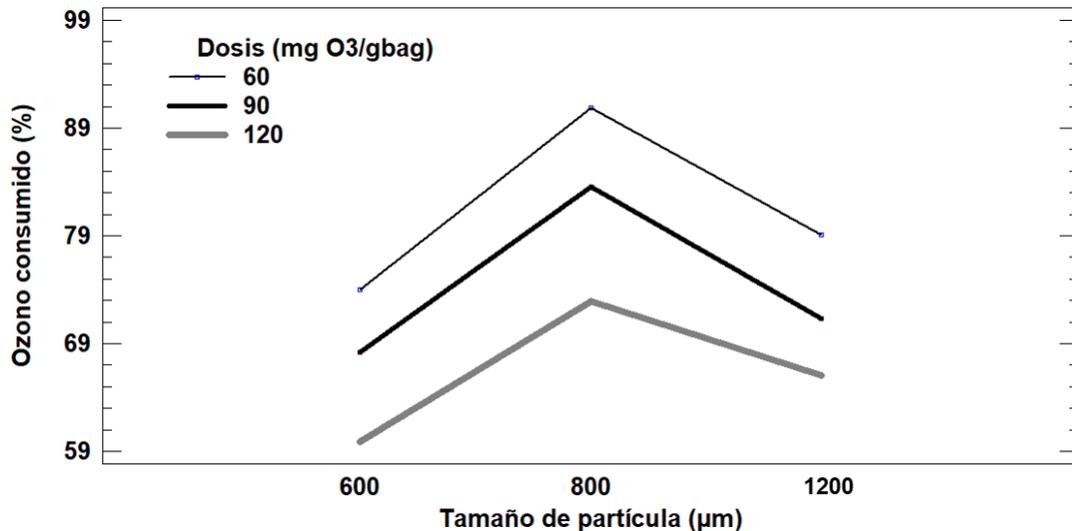
Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 10. Mientras que los análisis de las demás corridas se encuentran en el Anexo B de resultados. Tanto la dosis

de ozono como el tamaño de partícula mostraron, tener un efecto significativo sobre el ozono consumido, con un 95% de confianza.

**Tabla 10.** *Análisis de varianza para el consumo de ozono*

	<b>Factor</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
A	Dosis de ozono (mg O <sub>3</sub> /g <sub>bag</sub> )	21.65	<b>0.0072</b>
B	Tamaño de partícula (µm)	18.41	<b>0.0096</b>

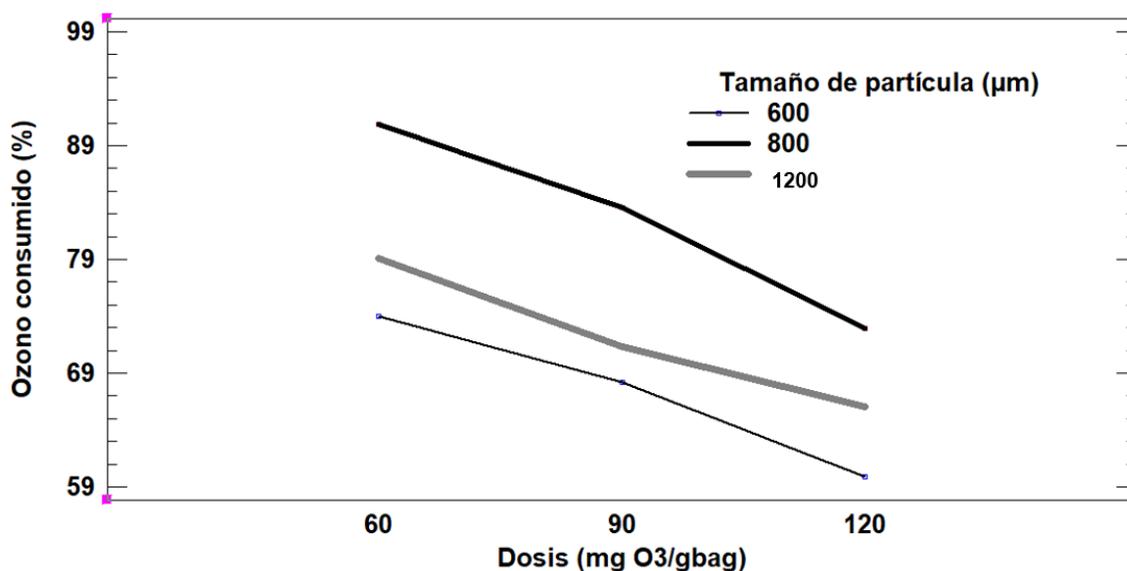
La Figura 13 muestra los efectos de interacción y los grupos homogéneos; el primer grupo está formado por los tamaños de partícula 600 y 1200 µm, mientras que el segundo grupo está formado por el tamaño de 850 µm. Los dos primeros presentan un consumo mayor de ozono. El tamaño de 850 µm para los tres pretratamientos tuvo un menor consumo de ozono en comparación a los tamaños de partícula de 600 µm y 1200 µm, los cuales presentan un comportamiento similar para las 3 corridas del pretratamiento mostrando un alto porcentaje de ozono consumido.



**Figura 12.** *Análisis del efecto del tamaño de partícula.*

La Figura 14 permite observar los efectos de interacción de los dos grupos homogéneos descritos anteriormente, con un orden inverso; el tamaño de

partícula menor tuvo un consumo de ozono más alto, de igual manera la dosis de ozono más baja fue en la que se obtuvo un consumo mayor de ozono durante el pretratamiento. La división de grupos homogéneos en esta gráfica es más notoria ya que tiene mayor efecto la dosis de ozono en comparación del tamaño de partícula, desde el punto de vista estadístico.



**Figura 13.** *Análisis del efecto de la dosis de ozono.*

La Tabla 11 presenta el resumen del ANOVA para la degradación de LIA. El tamaño de partícula mostró ser estadísticamente significativa sobre la degradación de LIA, con un 95% de confianza.

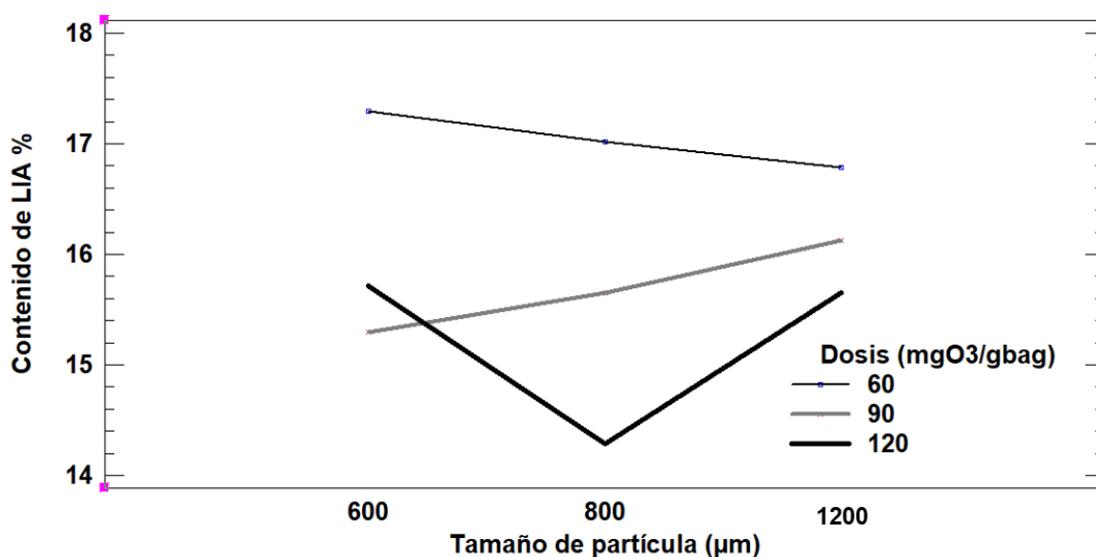
**Tabla 11.** *Análisis de varianza para el contenido de LIA*

	<b>Factor</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
A	Dosis de ozono (mg O <sub>3</sub> /gbag)	2.52	0.1961
B	Tamaño de partícula (μm)	7.79	<b>0.0417</b>

Las dosis de 90 y 120 mg O<sub>3</sub>/gbag tienen un efecto similar sobre el contenido de LIA, mientras que la dosis de 60 mg O<sub>3</sub>/gbag tuvo un efecto menor sobre la degradación de LIA. Para alcanzar una mayor degradación de LIA se recomienda emplear una dosis de 90 mg O<sub>3</sub>/gbag y un tamaño de partícula de 850 μm, ya que,

del grupo, la dosis de 90 mg O<sub>3</sub>/g<sub>bag</sub> requiere un menor gasto energético que la dosis de 120 mg O<sub>3</sub>/g<sub>bag</sub>. De igual manera, el gasto energético para obtener un tamaño de partícula de 850 µm es menor que el requerido para obtener 600 µm.

La Figura 15 muestra los efectos de interacción de los factores e indirectamente los grupos homogéneos para el contenido de LIA, donde se muestra que se puede dividir el efecto en dos grupos homogéneos. Estadísticamente existen dos grupos homogéneos, uno conformado por las dosis de 90 y 120 mg O<sub>3</sub>/g<sub>bag</sub>, y otro conformado por la dosis de 60 mg O<sub>3</sub>/g<sub>bag</sub>.

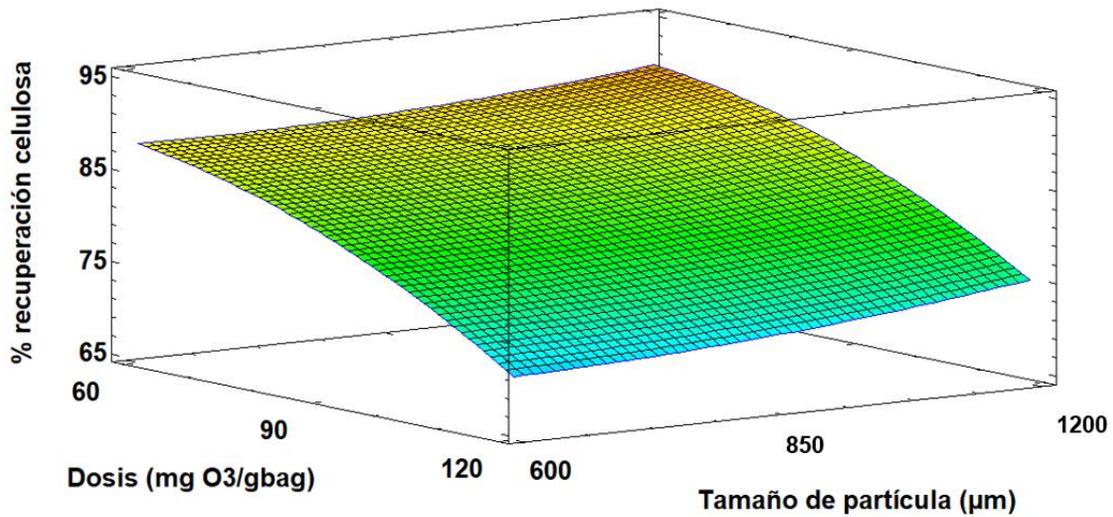


**Figura 14.** Efectos principales de la dosis de ozono y el tamaño de partícula sobre el contenido de LIA.

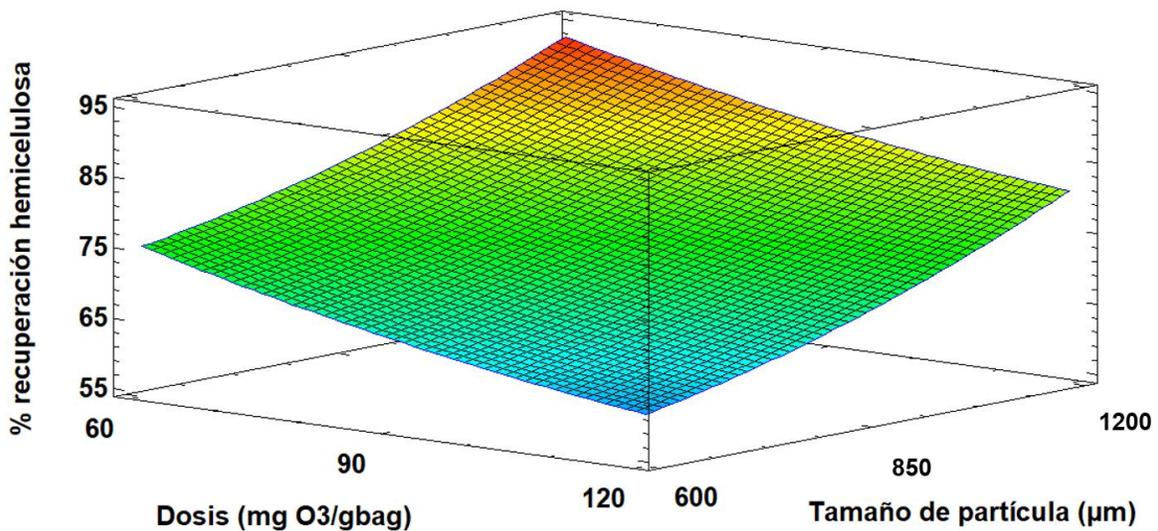
La optimización estadística se obtuvo a partir de una superficie de respuesta considerando solo el contenido de celulosa y hemicelulosa, con el fin de aumentar la recuperación de estos carbohidratos.

Las Figuras 16 y 17 presentan las condiciones óptimas para la recuperación de carbohidratos; el tamaño de partícula de 850 a 1000 µm y dosis de ozono menor son los mejores para una recuperación alta de celulosa y hemicelulosa como se muestra en la parte más oscura de las gráficas el cual corresponde 41.74% de contenido de celulosa y a 17.93% de contenido de hemicelulosa.

El experimento cumple con los supuestos de varianza constante e independencia mostrados en las Figuras 9 a 12 del Anexo B, por lo que está validado estadísticamente.



**Figura 15.** Diagrama de superficie de respuesta del porcentaje de recuperación de celulosa.



**Figura 16.** Diagrama de superficie de respuesta de la recuperación de hemicelulosa.

# Conclusiones



La implementación del pretratamiento de ozono en el bagazo de agave permitió identificar y analizar los factores que influyen en el proceso.

La evaluación del pretratamiento con ozono del bagazo de agave demuestra que el consumo de ozono aumenta al disminuir el tamaño de partícula y la dosis de ozono, para una humedad del 45% p/p del material. El consumo máximo de ozono fue del 83%, para una dosis de 60 mg  $O_3/g_{bag}$  y 600  $\mu m$  tamaño de partícula.

La recuperación de celulosa fue de al menos el 70.82% y de hemicelulosa del 60.21%, mientras que la máxima recuperación de celulosa fue del 91.37% y 90.59% de hemicelulosa para una dosis de 60 mg  $O_3/g_{bag}$ , tamaño de partícula de 850  $\mu m$ .

A mayores dosis de ozono (90-120 mg  $O_3/g_{bag}$ ) se presenta una mayor degradación de carbohidratos y una mayor degradación de LIA con un mayor incremento en LSA. En general, para todos los pretratamientos, la generación de inhibidores HMF y furfural fue menor a 0.4 mg  $O_3/g_{bag}$ .

El factor con mayor influencia fue la dosis de ozono; Las mejores condiciones del pretratamiento para una alta recuperación de azúcares y bajo consumo de energía es de 60 mg  $O_3/g_{bag}$  y un tamaño de partícula de 850  $\mu m$ .

Los resultados del pretratamiento muestran que se genera un cambio en la estructura de la pared celular debido a las altas recuperaciones de celulosa y remoción de LIA, por lo tanto, en una hidrólisis enzimática posterior se espera alcanzar altos rendimientos de azúcares para generar biocombustibles.



# **Bibliografía**



- Abreu-Sherrer, J. S. (2013). *Aprovechamiento del bagazo de Agave Tequilana Weber para la producción de biohidrogeno*. San Luis Potosí.
- Agbor, V., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. (2011). Biomass pretreatment: fundamental toward application. *Biotechnology advances*, 29, 675-685.
- Akobi, C., Hafez, H., & Nakhla, G. (2016). The impact of furfural concentrations and substrate-to-biomass ratios on biological hydrogen production from synthetic lignocellulosic hydrolysate using mesophilic anaerobic digester sludge. *Bioresource technology*, 598-606.
- Arenas-Cárdenas, P. (2015). *Proceso para el pre-tratamiento de bagazo de caña de azúcar con ozono para la recuperación de azúcares reductores*. Guadalajara: Tesis de maestría en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), a. c.
- Arenas-Cárdenas, P., López-López, A., Moeller-Chávez, G., & León-Becerril, E. (2017). Current pretreatments of lignocellulosic residues in the production of bioethanol. *Waste and biomass valorization*, 8, 161-181.
- Beltran, J. F. (2003). *Ozone Reaction Kinetics for Water and Wastewater Systems*. Estados Unidos de America: CRC Press.
- Ben'ko, E., Manisova, O., & Lunin, V. (2013). Effect of ozonation on the reactivity of lignocellulose substrates in enzymatic hydrolysis to sugars. *Russian journal of Physical Chemistry*(87), 1108-1113.
- Brandon, S., Eiteman, M., Patel, K., Richbourg, M., Miller, D., Anderson, W., & Peterson, J. (2008). Hydrolysis of Tifton 85 bermudagrass in a pressurized batch hot water . *Journal of chemical technology and biotechnology*, 505-512.
- Bustamante, P. D. (2009). *El mercado de bonos de carbono en México; generalidades y perspectivas de desarrollo*. San Luis Potosi: Tesis de licenciatura de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Caicedo, J., & Medina, J. (2011). *Ingenieria química.org*. Recuperado el 2017, de <http://www.ingenieriaquimica.org/system/files/Calculos+basicos+en+la+Industria+Azucarera.pdf>.

- Cámara Nacional de la Industria Tequilera. (2017). *Información básica de la industria tequilera*. Obtenido de Tequileros.org: [http://tequileros.org/stuff/file\\_estadistica/1501005174.pdf](http://tequileros.org/stuff/file_estadistica/1501005174.pdf)
- Cardona, C., Quintero, J., & Paz, I. (2010). Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology, Elsevier*(101), 4754-4766.
- Chávez-sifontes, M., & Domine, M. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en ciencias e ingeniería, 4*, 15-46.
- Chundawat, S., Beckham, G., Himmel, M., & Dale, B. (2011). Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 121-138.
- Clemente, J. (25 de Junio de 2015). *How much oil does the world have left?* Obtenido de Forbes: <https://www.forbes.com/sites/judeclemente/2015/06/25/how-much-oil-does-the-world-have-left/#af857b45b1f0>
- Cuervo, L., Folch, J. L., & Quiroz, R. E. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología UNAM, 13*(3), 11-25.
- Demirbas, M. F. (2009). Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review. *Applied energy, Elsevier*(86), s151-s161.
- Department of Energy of US. (Febrero de 2016). *The Availability and Price of petroleum and petroleum products produced in countries other than Iran*. Obtenido de U.S energy information administration: <https://www.eia.gov/analysis/requests/ndaa/pdf/ndaa.pdf>
- Doadrio-Villarejo, A. L. (2013). *NOx COV y CFC: química de formación y destrucción del ozono atmosférico*. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia.
- Domínguez-Domínguez, M., Álvarez-Castillo, A., Granados-Baeza, M., & Hernández-Campos, F. (2012). Estudio de la cinética del pre-tratamiento e hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar. *Revista Iberoamericana de polimeros, 13*(4), 200-211.

- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Robers, P., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Analytical biochem*, 28, 350-356.
- Dutta, K., Daverey, A., & Lin, J. (2014). Evolution retrospective for alternative fuels: first to fourth generation. *Renewable energy*, 69, 114-122.
- Garcés-Paz, R. V., & Martinez-Silva, S. (2007). *Estudio del poder calorifico del bagazo de caña de azúcar en la industria azucarera de la zona de Risaralda*. Pereira: Trabajo de grado de la Universidad Tecnológica de Pereira.
- García-Cubero, M., Palacín, L., González-Benito, G., Bolado, S., Lucas, S., & Coca, M. (2012). An analysis of lignin removal in a fixed bed reactor by reaction of cereal straws with ozone. *Bioresource Technology*(107), 229-234.
- Gitifar, V., Eslamloueyan, R., & Sarshar, M. (2013). Experimental study and neural network modeling of sugarcane bagasse pretreatment with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and O<sub>3</sub> for cellulosic material conversion to sugar. *Bioresource Technology*(148), 47-52.
- González-García, Y., González-Reynoso, O., & Nungaray-Arellano, J. (2005). Potencial del bagazo de agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos . *e-Gnosis*, art 14.
- Gottschalk, C., Libra, A. J., & Saupe, A. (2010). *Ozonation of Water and Waste Water*. Alemania: Wiley-VCH.
- Hendriks, A. T., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100, 10-18.
- Henriksen, T., & Svendby, T. (2009). *Ozone and UV-radiation*. Obtenido de Universidad de Oslo: [http://www.uio.no/studier/emner/matnat/fys/FYS3610/h09/undervisningsmateriale/compendium/Ozone\\_and\\_UV\\_2009.pdf](http://www.uio.no/studier/emner/matnat/fys/FYS3610/h09/undervisningsmateriale/compendium/Ozone_and_UV_2009.pdf)
- Hu, F., & Ragauskas, A. (2012). Pretreatment and lignocellulosic chemistry. *BioEnergy Research*, 5, 1043-1066.

- Instituto del agua y las Ciencias. (2013). *Sistema generador de ozono*. Alicante: Sadyt. Obtenido de [http://www.sadyt.com/es\\_es/Images/Generador%20de%20ozono\\_tcm22-4724.pdf](http://www.sadyt.com/es_es/Images/Generador%20de%20ozono_tcm22-4724.pdf)
- Íñiguez, G., Acosta, N., Martínez, L., Parra, J., & González, O. (2005). Utilización de subproductos de la industria tequilera. Parte 7. Compostaje de bagazo de agave y vinazas tequileras. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 38-50.
- Jiang, L., Fang, Z., Li, X., Luo, J., & Fan, S. (2013). Combination of dilute acid and ionic liquid pretreatments of sugarcane bagasse for glucose by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 1942-1946.
- Jin, S., & Chen, H. (2006). Superfine grinding of steam –exploded rice straw and its enzymatic. *Biochemical Engineering journal*, 225-230.
- Kamei, I., Hirota, Y., & Meguro, S. (2012). Integrated delignification and simultaneous saccharification and fermentation of hard wood by a white-rot fungus, *Phlebia* sp. MG-60. *Bioresource Technology*, 126, 137-141.
- Kestur, G. S., Flores-Sahagun, H. S., Dos Santos, P. L., Dos Santos, J., Mazzaro, I., & Mikowski, A. (2013). Characterization of blue agave bagasse fibers of México. *Composites, A* 45, 153-161.
- Kojima, Y., & Yoon, S. L. (2008). Improved enzymatic hydrolysis of waste paper by ozone pretreatment. *Cycles waste manage*(10), 134-139.
- Kumar, D., & Murthy, G. (2011). Impact of pretreatment and downstream processing technologies on economics and energy in cellulosic ethanol production. *Biotechnology for biofuels*, 4, 27-33.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods of pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemical Research*, 48, 3713-3729.
- Laboratorio de bioconversiones. (2016). *Bioconversiones*. Recuperado el 2017, de <https://sites.google.com/site/equipo3bioconversiones4bv1/reporte-1>.
- Lacerda, V. S. (2014). *Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos para la producción de biocombustibles y bioproductos*. Valladolid: Tesis doctoral en

la Universidad de Valladolid del departamento de ingeniería agrícola y forestal.

- León-Becerril, E., & López-López, A. (2015). *Pre-tratamiento de residuos lignocelulósicos con ozono para incrementar el rendimiento de la sacarificación de azúcares reductores*. Solicitud de patente: MX/a/2015/014521, Folio: MX/E/2015/075680. (Actualmente en examen de fondo).
- Li, H., Foston, M. B., Kumar, R., Samuel, R., Gao, X., Hu, F., . . . Wyman, C. E. (2012). Chemical composition and characterization of cellulose for Agave as a fastgrowing, drought-tolerant biofuels feedstock. *RSC advances*, 2, 4951-4958.
- Li, X., & Chapple, C. (2010). Understanding Lignification: Challenges Beyond Monolignol Biosynthesis. *Plant Physiology*, 154, 449-452.
- Lynd, L. R. (1996). Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment and policy. *Annual reviews energy environment*, 21, 43-65.
- Maciel-Álvarez, C. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Ecoinforma, economía UNAM, Julio-Agosto*(39).
- Mamleeva, N., Autlov, S., Fionov, A., Bazarnova, N., & Lunin, V. (2009). The oxidative destruction of lignin in the ozonation of wood. *Russian journal of Physical Chemistry*, 83, 745-751.
- Montiel-Corona, V., & Razo-Flores, E. (2018). Continuous hydrogen and methane production from Agave tequilana bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency. *Bioresource technology*, 334-341.
- Mood, S., Golfeshan, A., Tabatabaei, M., SalehiJouzani, G., Najafi, G., Gholami, M., & Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and sustainable energy, Elsevier reviews*(27), 77-83.

- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology, Elsevier review*, 25.
- Murphy, J., & McCarthy, K. (2005). Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. *Applied energy*, 148-166.
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and sustainable energy reviews, Elsevier review*(14), 587-597.
- Neely, W. C. (1984). Factors affecting the pretreatment of biomass with gaseous ozone. *Biotechnology & bioengineering*(26), 59-65.
- Nigam, P. S., & Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in energy and combustion science, Elsevier*(37), 52-68.
- ONU. (2009). Recuperado el 2017, de <http://en.cop15.dk/>.
- Parzanese, M. (2011). *Tecnologías para la Industria Alimentaria. Ozono en alimentos*. Obtenido de Ministerio de agroindustria de Argentina: [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha\\_04\\_Ozono.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_04_Ozono.pdf)
- Perez, J., Ballesteros, I., Ballesteros, M., Saéz, F., Negro, M., & Manzanares, P. (2008). Optimizing Liquid Hot Water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. *Fuel*, 87, 17-18.
- Peréz-Fuentes, J., & Pacheco-Llanes, R. (2011). *Para entender el cambio climático: un problema de todos, una responsabilidad de todos*. Cd. de México: Congreso de la unión, Camara de Diputados, LXI legislatura.
- Perez-Pimienta, J. A., López-Ortega, M. G., Chavéz-Carvayar, J. A., Varanasi, P., Stavila, V., Cheng, G., . . . Simmons, B. A. (2015). Characterization of agave bagasse as a function of ionic liquid pretreatment. *ScienceDirect*, 180-188.
- Prinsen, P. (2010). *Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas*. Sevilla: Tesis de maestría en el Instituto de recursos naturales y agrobiología de Sevilla.

- Secretaría de Energía. (2014). *Estrategía nacional de transición energética y aprovechamiento sustentable de la energía*. Recuperado el 2018, de Portal único del gobierno de los Estados Unidos Mexicanos: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/215/ENTEASE\\_2014.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/215/ENTEASE_2014.pdf)
- Severiche-Sierra, C. A., & Acevedo-Barrios, R. L. (2013). Biogás a partir de residuos orgánicos y su apuesta como combustibles de segunda generación. *INGENIUM*, 28, 6-15.
- Shakhashiri, Z. B. (2017). *Ozone*. Obtenido de Science is fun: <http://scifun.org/CHEMWEEK/Ozone2017.pdf>
- Sims, R., Mabee, W., Saddler, J., & Taylor, M. (2009). An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology, Elsevier*, (101), 1570-1580.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. T., & Crocker, D. (2011). *Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass*. Colorado: National Renewable Energy Laboratory.
- Suacedo-Luna, J., Castro-Montoya, A. J., Rico, J. L., & Campos-García, J. (2010). Optimización de hidrólisis ácida de bagazo de agave tequilana Weber. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 91-97.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: a review. *Bioresource Technology, Elsevier review*(83), 1-11.
- Travaini, R., Barrado, E., & Bolado-Rodríguez, S. (2016). Effect of ozonolysis pretreatment parameters on the sugar release, ozone consumption and ethanol production from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology, Elsevier*(214), 150-158.
- Travaini, R., Martín-Juaréz, J., Lorenzo-Hernando, A., & Bolado-Rodríguez, S. (2016). Ozonolysis: An advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. *Bioresource technology, Elsevier*(199), 2-12.
- Travaini, R., Otero, M. D., Da-Silva, R., & Bolado, S. (2013). Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: Effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. *Bioresource Technology*(133), 332-339.

- UNAM. (2008). *Fundamentos y técnicas de análisis de alimentos*. Facultad de química, UNAM, Departamento de alimentos y biotecnología.
- Xu, C., Ma, F., Zhang, X., & Chen, S. (2010). Biological Pretreatment of Corn Stover by *Irpex lacteus* for Enzymatic Hydrolysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58 (20), 10893-10898.
- Zaldivar, J., Nielsen, J., & Olsson, L. (2001). Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56 (1-2), 17-34.
- Zhang, L., Li, D., Wang, L., Wang, T., Zhang, L., Chen, X. D., & Mao, Z. (2008). Effect of steam explosion on biodegradation of lignin in wheat straw. *Bioresource Technology*, 8512-8515.
- Zumalacárregui-De Cárdenas, L. M., Pérez-Ones, O., Rodríguez-Ramos, P. A., Zumalacárregui-De Cárdenas, B. A., & Lombardi, G. (2015). Potencialidades del bagazo para la obtención de etanol frente a la generación de electricidad. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, XVI, 407-418. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.riit.2015.05.001>

# **Anexos**



## **Anexo A**

### Metodología

#### ***Método de NREL para determinación de lignina y carbohidratos***

##### Preparación de muestra

1. Colocar crisoles filtrantes en el horno de mufla a  $575 \pm 25^\circ\text{C}$  durante un mínimo de cuatro horas. Retirar los crisoles del horno directamente en un desecador y dejar enfriar al menos una hora. Pesar los crisoles con una precisión de 0.1 mg y registrar el peso.
2. Colocar nuevamente el crisol en el horno de mufla a  $575 \pm 25^\circ\text{C}$  en peso constante. El peso constante se define como menos de  $\pm 0.3$  mg de cambio en el peso sobre una hora de recalentamiento del crisol.
3. Pesar en matraces  $300.0 \pm 10$  mg de bagazo de agave. Cada muestra debe ser analizada en duplicado.
4. Añadir a cada matraz  $3.00 \pm 0.01$  mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 72%. Agitar el matraz para que la muestra sea homogenizada con el ácido agregado.
5. Colocar el matraz en un baño de agua ajustado a  $30 \pm 3^\circ\text{C}$  por 60 minutos. Agitando cada 5 a 10 minutos (sin retirar del baño de agua).
6. Una vez completada la hidrólisis de 60 minutos, retirar los matraces del baño de agua. Diluir el ácido a una concentración del 4% añadiendo  $84.00 \pm 0.04$  mL de agua desionizada.
7. Preparar los estándares para la recuperación del azúcar (SRS, por sus siglas en inglés). Estos recibirán el mismo tratamiento durante la hidrólisis y serán usados para corregir las pérdidas debido a la destrucción de azúcares. Entre éstos, deberán incluirse D(+)glucosa, D(+)xilosa, D(+)galactosa, L(+)arabinosa y D(+)manosa. Elegir concentraciones cercanas a las existentes en las muestras. Pesar la cantidad correspondiente del estándar y disolver en 10.0 mL de agua desionizada, posteriormente añadir 348  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico al 72%. Transferir el estándar preparado a un matraz.
8. Cubrir los matraces con aluminio y colocar en autoclave. Llevar a  $121^\circ\text{C}$  durante 60 minutos.
9. Después de completar el ciclo de la autoclave, dejar que los hidrolizados se enfríen lentamente a temperatura ambiente antes de retirar las tapas.

### **Lignina Insoluble Ácida (LIA)**

1. Filtrar en vacío la solución de hidrólisis anteriormente preparada a través de uno de los crisoles filtrantes previamente pesados.
2. Trasferir el hidrolizado filtrado a un tubo de almacenamiento. Esta muestra se utilizará posteriormente para determinar lignina soluble ácida, así como carbohidratos estructurales e inhibidores por cromatografía líquida. Si estas determinaciones no se llevan a cabo durante las siguientes 6 horas, refrigerar el líquido hidrolizado durante un máximo de dos semanas.
3. Utilizar agua desionizada para transferir cuantitativamente todos los sólidos remanentes en el crisol preparado previamente.
4. Colocar los crisoles con residuo insoluble húmedo en estufa a  $105 \pm 3$  °C hasta alcanzar un peso constante, por un tiempo mínimo de cuatro horas.
5. Retirar los crisoles de la estufa y enfriar en un desecador. Registrar el peso de los crisoles con residuo sólido.
6. Colocar los crisoles y el residuo sólido en el horno de mufla a  $575 \pm 25$  °C durante  $24 \pm 6$  horas.
7. Retirar cuidadosamente el crisol del horno de mufla directamente en un desecador y dejarlo enfriar durante un tiempo (mínimo una hora). Pesar los crisoles y cenizas.
8. Colocar los crisoles y cenizas de nuevo en el horno de la mufla a un peso constante.
9. Calcular el porcentaje del residuo insoluble ácido y de la lignina insoluble ácida (AIR y LIA, respectivamente) de cada muestra con los pesos correspondientes y con las siguientes fórmulas.

$$\% AIR = \frac{(crisol_{con\ residuo}) - (crisol)}{peso\ seco_{del\ horno}} \times 100$$

*Ecuación A. 1*

$$\% LIA = \frac{(crisol_{con\ residuo} - crisol) - (crisol_{con\ ceniza} - crisol)}{peso\ seco_{del\ horno}} \times 100$$

*Ecuación A. 2*

$$Peso\ seco = \frac{(Peso\ de\ muestra\ seca)(\%Sólidos\ totales)}{100}$$

*Ecuación A. 3*

### **Lignina Soluble Acida (LSA)**

En un espectrofotómetro en el rango UV, determinar un blanco con agua desionizada a una longitud de onda de 240 nm.

Usar el hidrolizado líquido filtrado y resguardado anteriormente. En caso necesario, diluir la muestra (con agua desionizada) hasta obtener absorbancias de 0.7 – 1.0.

Calcular el porcentaje de lignina soluble ácida con la siguiente fórmula.

$$\% LSA = \frac{\text{absorbancia}_{240 \text{ nm}} * 87 \text{ mL} * \text{dilución}}{\text{absortividad} * \text{peso seco}_{\text{del horno}} * \text{longitud trayecto de celda}} \times 100$$

*Ecuación A. 4*

Donde los factores para resolver la ecuación A.4 corresponden a:

$$\text{Dilución} = \frac{\text{volumen}_{\text{muestra}} + \text{volumen}_{\text{disolvente}}}{\text{volumen}_{\text{muestra}}}$$

*Ecuación A. 5*

\*Los 87mL corresponden a la cantidad de agua agregada a la muestra durante el desarrollo de la metodología.

Absortividad = 25 L/g cm

Longitud del trayecto de la celda = 1.00 cm

### **Determinación de glucosa, xilosa e inhibidores por HPLC**

A partir del líquido hidrolizado se podrán identificar y cuantificar monosacáridos.

1. Preparar los estándares de calibración con diferentes concentraciones de los compuestos a cuantificar en el bagazo.
2. Preparar las muestras para analizarlas por cromatografía líquida (HPLC), a partir de líquido filtrado y resguardado. (Preparar diluciones si son necesarias y filtrar con filtro de jeringa de 0.45 µm poro).
3. Analizar los estándares de calibración y muestras preparadas usando una columna Biorad Aminex HPX-87H. Las condiciones son las siguientes:
  - Volumen de muestra por vial: 50 µL

- Fase móvil: 5 mM de ácido sulfúrico, filtrada (0.25 µm poro) y degasificada
  - Flujo fase móvil: 0.6 mL/min
  - Temperatura de columna: 55-65 °C
  - Detector: Infrarrojo (IR)
  - Temperatura del detector: cercana a la temperatura de la columna
  - Tiempo de corrida: 30 min
4. Realizar una curva de calibración para cada analito (estándares de calibración), con una regresión lineal. A partir de estas curvas, determinar la concentración de cada analito presente en las muestras preparadas del hidrolizado líquido (muestras líquidas del bagazo hidrolizado y de los estándares para la recuperación de azúcares -SRS-).
5. Para los estándares de recuperación de azúcares (SRS), calcular el porcentaje de cada analito recuperado después de la hidrólisis ácida (tomando en cuenta cualquier dilución hecha previa al análisis por HPLC), con la siguiente fórmula.

$$\%Recuperación_{azúcar} = \frac{\text{concentración detectada por HPLC}}{\text{concentración conocida antes de hidrólisis}} * 100$$

*Ecuación A. 6*

6. Con el porcentaje de recuperación de cada azúcar, corregir la correspondiente concentración de cada carbohidrato obtenida por HPLC para cada muestra analizada (muestras líquidas del bagazo hidrolizado) con la siguiente fórmula.

$$C_{corregida} = \frac{C_{HPLC} * \text{factor dilución}}{\%Recuperación_{azúcar}/100}$$

*Ecuación A. 7*

7. Calcular la concentración de azúcares poliméricos a partir de la concentración corregida de azúcares monoméricos, usando un factor de corrección anhidro de 0.88 (o 132/150) para azúcares de cinco carbonos (xilosa y arabinosa) y de 0.90 (o 162/180) para azúcares de seis carbonos (glucosa, galactosa, manosa), con la siguiente fórmula.

$$C_{polimero} = C_{corregida} * corrección_{anhidro}$$

*Ecuación A. 8*

8. Para calcular el porcentaje de cada azúcar monomérica o polimérica por cada gramo de biomasa utilizada, usar la siguiente fórmula.

$$\%azúcar_{mono\ o\ poli} = \frac{C_{corregida} * volumen_{filtrado} * \frac{1g}{1000mg}}{peso\ seco\ muestra\ inicial} * 100$$

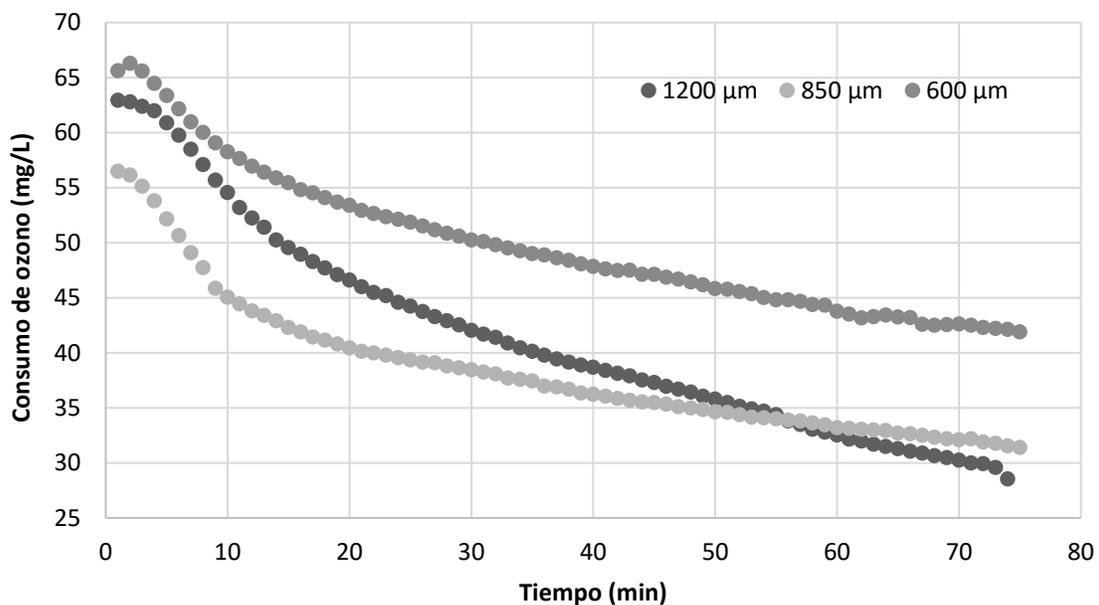
*Ecuación A. 9*

## Anexo B. Resultados

Este apartado muestra los resultados de la cinética de los pretratamientos realizados. Para su análisis, los resultados se agrupan por dosis de ozono.

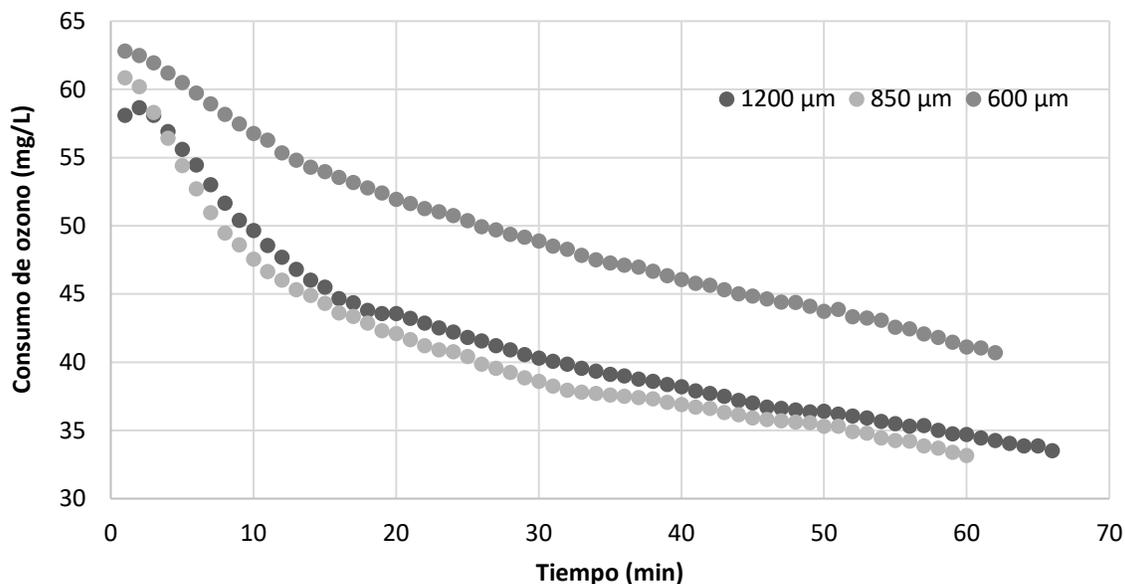
### **Consumo de ozono durante el pretratamiento**

La Figura B.1 muestra la concentración de ozono consumido con los tres tamaños de partícula y dosis de 120 mg O<sub>3</sub>/g<sub>bag</sub>. El patrón de ozono consumido es similar para los 3 tamaños de partícula, hasta un tiempo de 75 min, se observa un mayor consumo para el tamaño de partícula de 850 μm.



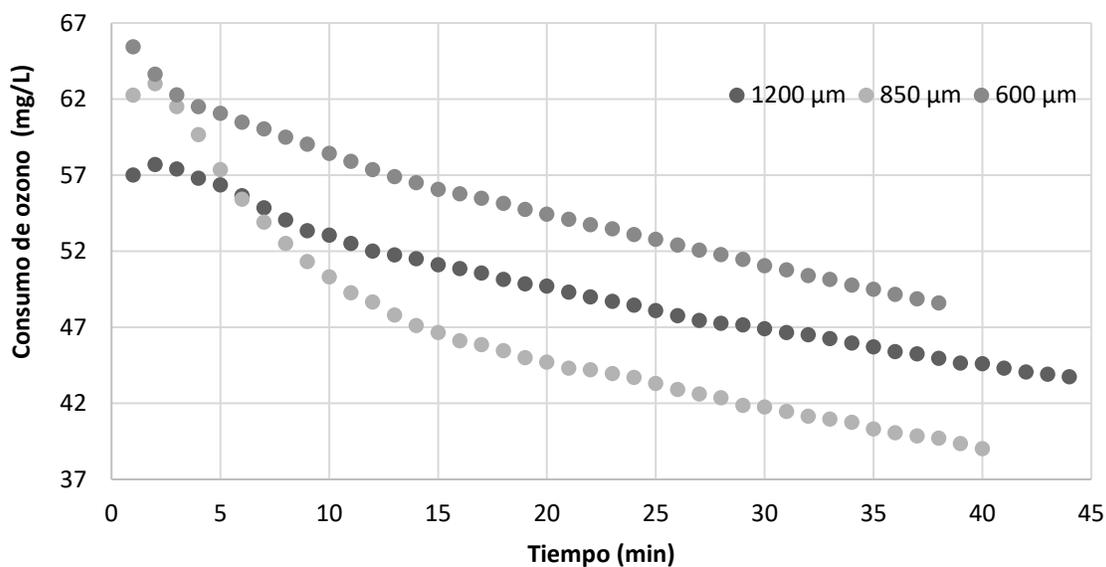
**Figura B. 1.** Consumo de ozono, dosis de 120 mg O<sub>3</sub>/g<sub>bag</sub>

La Figura B.2 muestra que para un tamaño de partícula de 600 μm el consumo es menor que para los otros dos tamaños de partícula.



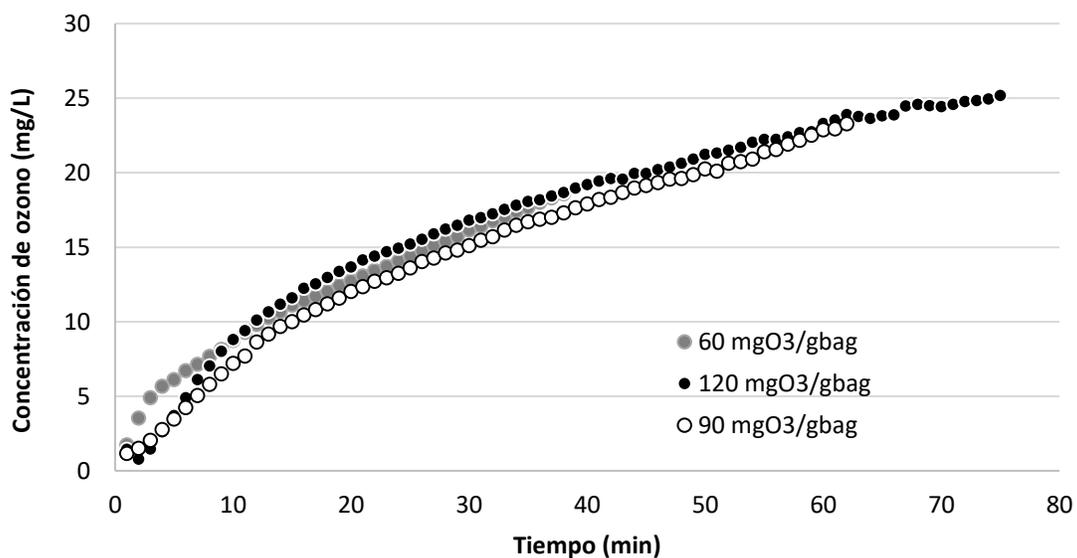
**Figura B. 2.** Consumo de ozono, dosis de 90 mg O<sub>3</sub>/g<sub>bag</sub>.

En la Figura B.3 se observa que, con la dosis de 60 mg O<sub>3</sub>/g<sub>bag</sub>, para los tres tamaños de partícula, el consumo de ozono se incrementa, a diferencia del consumo en las dosis más altas. Comparando los óptimos de cada dosis (600 μm), con la dosis más alta se obtuvo un consumo de ozono mínimo de 41.9 mg/L, similar al consumo de la dosis intermedia.



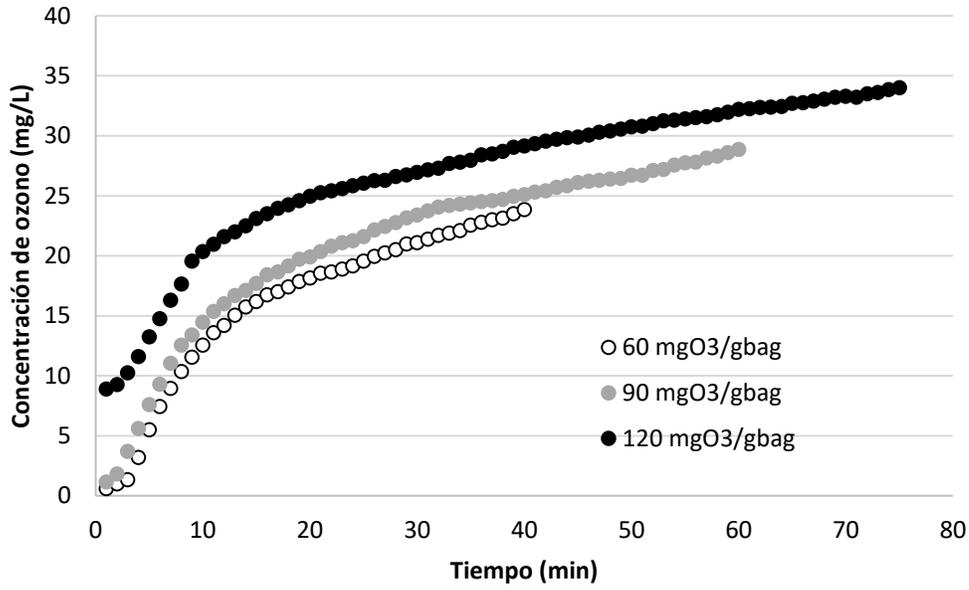
**Figura B. 3** Consumo de ozono, dosis de 60 mg O<sub>3</sub>/g<sub>bag</sub>

La Figura B.4 muestra la concentración de ozono residual durante la reacción entre el ozono y el bagazo de agave con un tamaño de partícula de  $600\ \mu\text{m}$ . El patrón para las tres dosis de ozono aplicadas es similar.



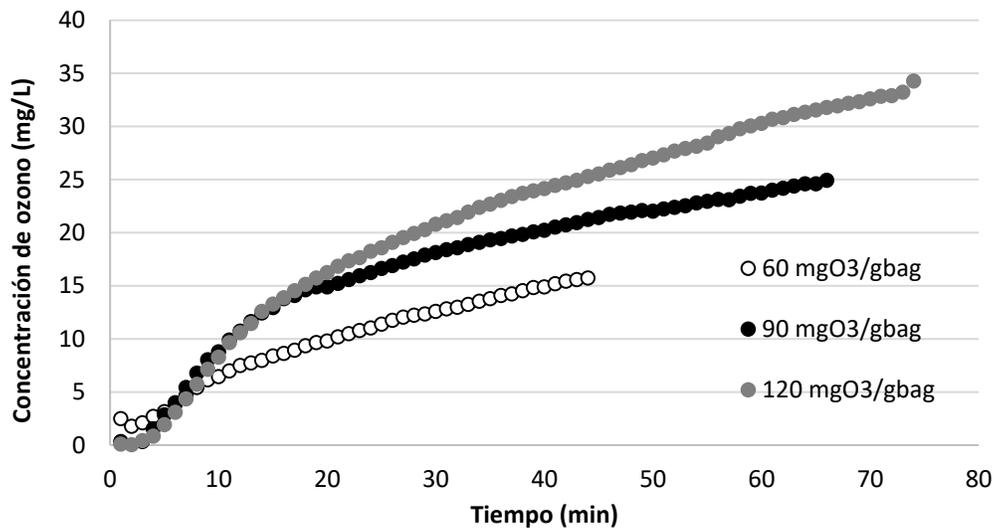
**Figura B. 4.** *Concentración de ozono residual, tamaño de partícula de  $600\ \mu\text{m}$ .*

La Figura B.5 muestra que para un tamaño de partícula de  $850\ \mu\text{m}$  si hay diferencia en el comportamiento del residual. La dosis de ozono más alta muestra durante todo el proceso tener una concentración residual mas alta a diferencia de la dosis de 60 y 90 mg O<sub>3</sub>/g<sub>bag</sub>.



**Figura B. 5.** *Concentración de ozono residual, tamaño de partícula de 850 μm.*

En la Figura B.6 se observa que, aunque presentan un comportamiento similar entre sí, no se empalman unas con otras como con el tamaño de 600 μm.



**Figura B. 6** *Concentración de ozono residual, tamaño de partícula de 1200 μm.*

## **Optimización estadística**

### **LSA**

La Tabla B.1 muestra los resultados del análisis estadístico respecto el aumento en lignina ácida soluble los cuales, tuvieron un valor P mayor al de significancia de 0.05 con un 95% de confianza. El valor-P del efecto de tamaño de partícula presenta cercanía al 0.05 para llegar a tener un efecto sobre la LSA. A diferencia de la dosis de ozono cuyo valor muestra que no tiene efecto alguno.

**Tabla B. 1. Análisis de varianza para LSA**

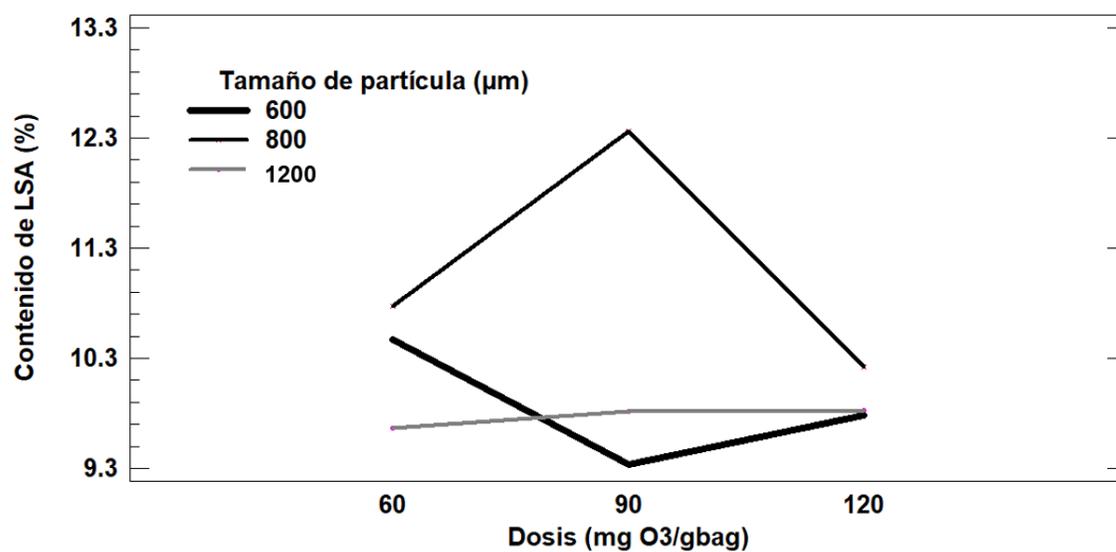
	<b>Factor</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
A	Dosis de ozono (mg O <sub>3</sub> /g <sub>bag</sub> )	2.52	0.6071
B	Tamaño de partícula (µm)	7.79	0.0488

Al hacer un análisis de rangos múltiples para el tamaño de partícula se observa que existen 2 grupos homogéneos: un grupo de 850 y 1200 µm y el otro grupo conformado por 600 y 1200 µm (Tabla B.2).

**Tabla B. 2. Análisis de rangos múltiples para LSA**

<b>Tamaño de partícula (µm)</b>	<b>LS-mean</b>	<b>Grupo homogéneo</b>
850	9.323	2
1200	10.05	1
600	10.613	1

La Figura B.4 muestra la división de los grupos homogéneos, el primero para 600 y 1200 µm, y el segundo para tamaños de partícula de 850 y 1200 µm. El contenido de LSA aumenta considerablemente con la dosis de 90 mg O<sub>3</sub>/g<sub>bag</sub> y un tamaño de partícula de 600 µm. mientras que el tamaño de 850 µm es en el que se obtuvo la menor cantidad de lignina soluble.



**Figura B. 7.** Efectos principales de la dosis de ozono y el tamaño de partícula sobre el contenido de LSA

#### Celulosa

La Tabla B.3 muestra los resultados del análisis estadístico respecto a la recuperación de celulosa, los cuales tuvieron un valor P mayor al de significancia de 0.05 con un 95% de confianza. Pese a ello al hacer un análisis de múltiples rangos se muestra que el efecto de la dosis de ozono se puede dividir en 2 grupos homogéneos.

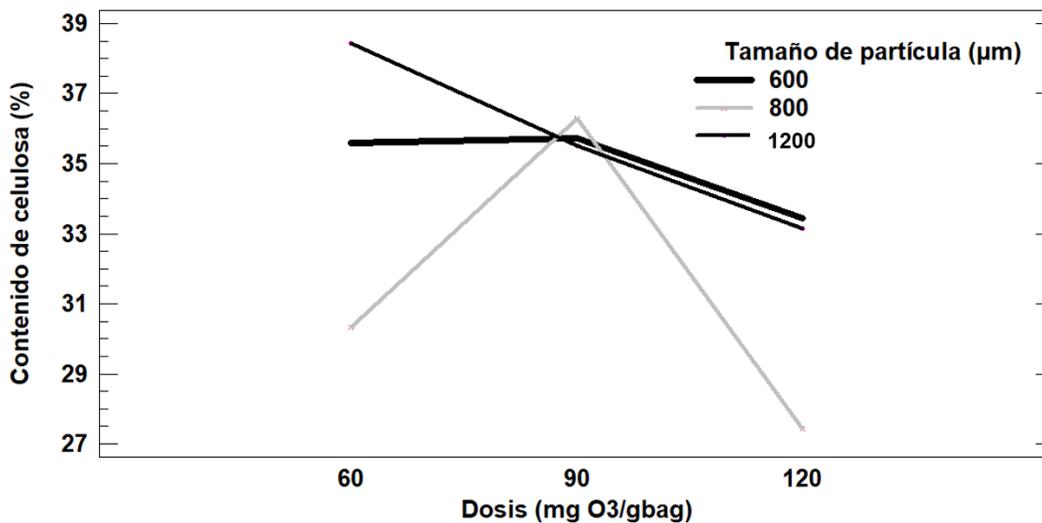
**Tabla B. 3.** Análisis de varianza para celulosa

	<b>Factor</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<i>A</i>	Dosis de ozono (mg O <sub>3</sub> /gbag)	0.68	0.0859
<i>B</i>	Tamaño de partícula (μm)	4.82	0.5550

El análisis de rangos múltiples muestra un grupo de 120 y 90 mg O<sub>3</sub>/gbag y el otro grupo conformado por 60 y 90 mg O<sub>3</sub>/gbag, (Tabla B.4). La Figura B.5 muestra que el contenido de celulosa tiene valores más altos con la dosis de 60 mg O<sub>3</sub>/gbag con los 3 tamaños de partícula.

**Tabla B. 4. Análisis de rangos múltiples para celulosa**

Dosis de ozono (mg O <sub>3</sub> /g <sub>bag</sub> ,)	LS-mean	Grupo homogéneo
120	9.323	1
90	10.05	1-2
60	10.613	2



**Figura B.8. Efectos principales de la dosis de ozono y el tamaño de partícula sobre el contenido de celulosa**

#### Hemicelulosa

La Tabla B.5 muestra los resultados del análisis estadístico respecto a la recuperación de hemicelulosa, los cuales tuvieron un valor P mayor al de significancia de 0.05 con un 95% de confianza. Con lo que se determina que ninguno de los factores tuvo efecto sobre la variable de respuesta, en este caso, hemicelulosa.

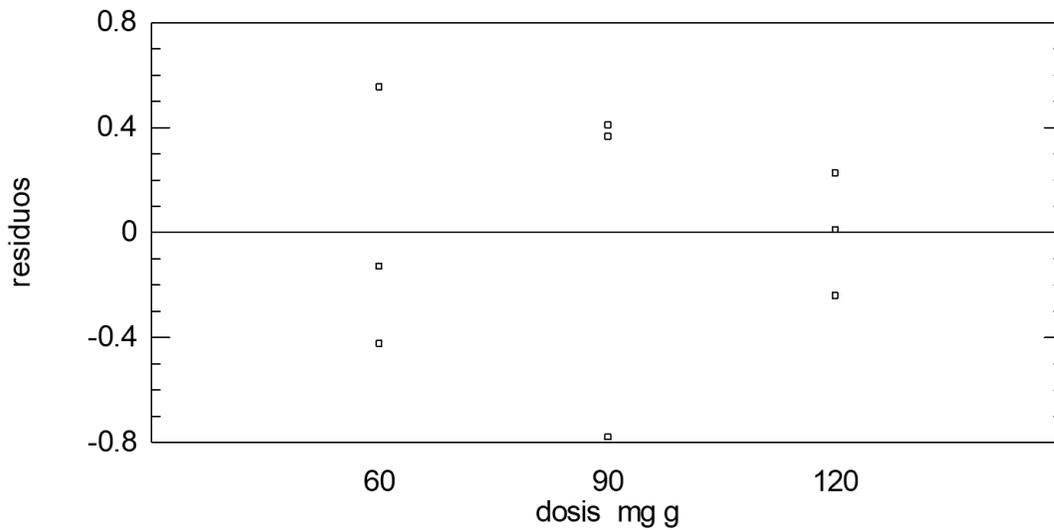
**Tabla B. 5. Análisis de varianza para hemicelulosa**

	Factor	Razón-F	Valor-P
A	Dosis de ozono (mg O <sub>3</sub> /g <sub>bag</sub> )	0.68	0.7089
B	Tamaño de partícula (μm)	0.38	0.5578

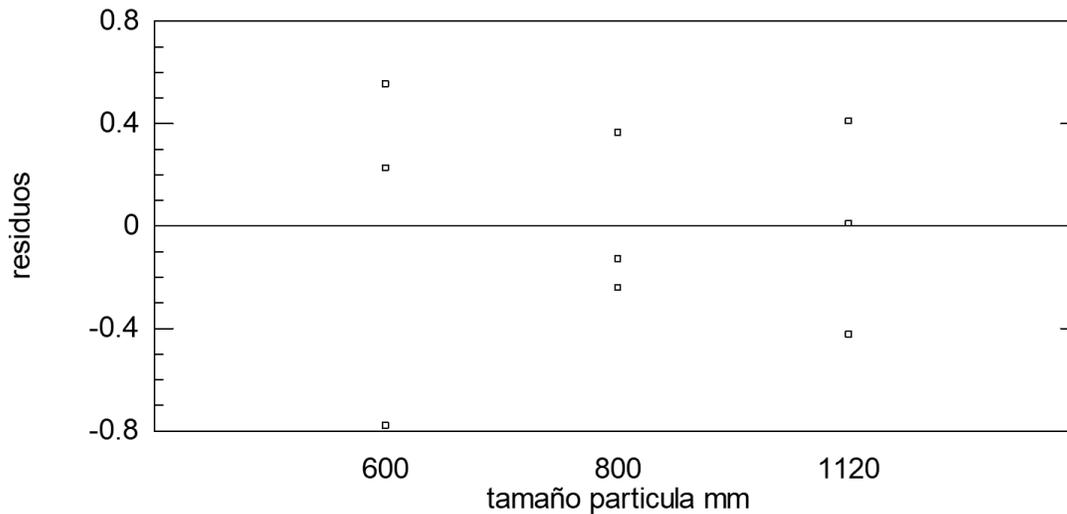
### Validación estadística

El experimento cumple con los supuestos de varianza constante e independencia mostrados en las Figuras B9 a B12 del Anexo B, por lo que está validado estadísticamente.

Varianza constante

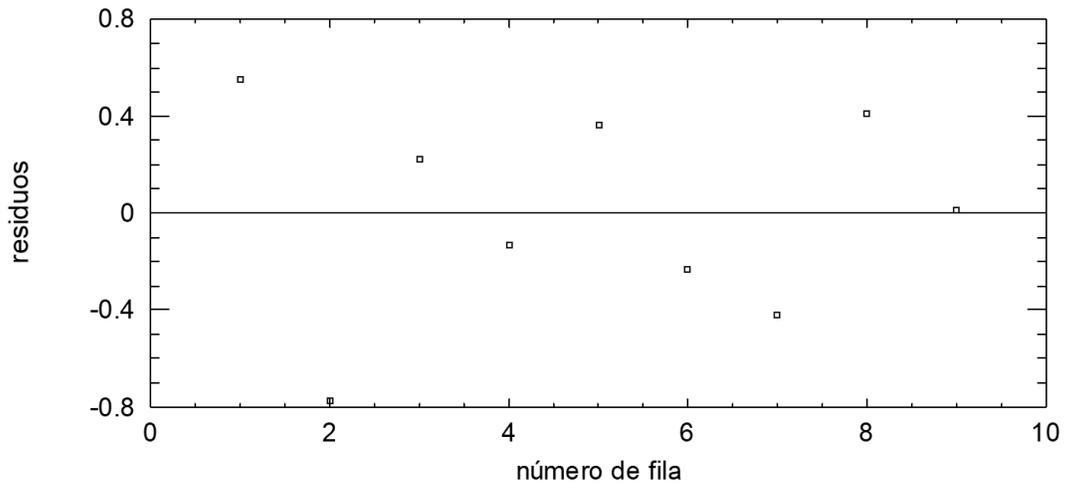


**Figura B. 9.** Residuales de LIA con respecto a la dosis de ozono



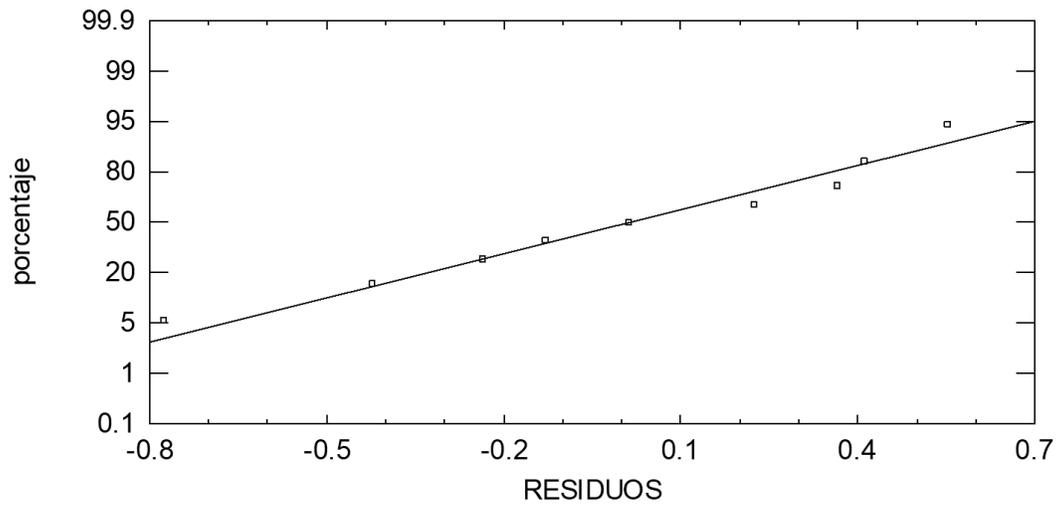
**Figura B. 10.** Residuales de LIA con respecto al tamaño de partícula.

### Independencia



**Figura B. 11.** *Gráfica de independencia*

### Normalidad



**Figura B. 12** *Gráfica de normalidad*