

## Evaluación de Tres Métodos de Pretratamiento Químico sobre la Deslignificación de Tallos de Yuca

Juan G. Reales<sup>(1)</sup>, Hader I. Castaño<sup>(2)</sup> y José E. Zapata<sup>(3)</sup>

(1) Univ. Popular del Cesar. Diagonal 21 No. 29-56. Valledupar, Colombia. (e-mail: juguireal@gmail.com)

(2) Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. Carrera 48 N° 7-151. Medellín, Colombia.  
(e-mail: hicastano@elpoli.edu.co)

(3) Universidad de Antioquia. Calle 67 N° 53-108. Medellín, Colombia. (e-mail: jedgar\_4@yahoo.es)

*Recibido Oct. 1, 2015; Aceptado Dic. 2, 2015; Versión final Feb. 1, 2016, Publicado Jun. 2016*

---

### Resumen

Se evaluó el efecto de tres tipos de pretratamiento (ácido, alcalino y organosolv), sobre la remoción de lignina de la biomasa de tallos de yuca. Se utilizó una concentración de sólidos 10% (p/v). En el tratamiento ácido se evaluó la concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entre 0.79 y 2.21 %p/v de, y el tiempo entre 8 y 22 minutos, a 121° C y 15 psi. En el alcalino se evaluó la concentración de NaOH entre 0.59 y 3.41 % p/v y el tiempo entre 4 y 11 h, a 60° C y en el organosolv se evaluó la concentración de etanol entre 41.7 y 98.3 % v/v de etanol y el tiempo entre 4 y 11 h, a 60° C. Se realizó un análisis de regresión múltiple tomando el tiempo de reacción y la concentración del agente deslignificante como variables numéricas continuas, con el objetivo de evaluar el efecto del método usado sobre la remoción de lignina de la matriz lignocelulósica. Las variables con influencia significativa sobre la remoción de lignina fueron concentración de ácido, tiempo y concentración de álcalis, y el tiempo en el proceso organosolv. El pretratamiento alcalino presentó los mayores porcentajes de remoción de lignina mientras que el pretratamiento organosolv mostró los niveles más bajos.

*Palabras clave: tallos de yuca; lignocelulósicos; deslignificación; biocombustibles; azúcares fermentables*

## Evaluation of three Methods of Chemical Pretreatment on the Delignification of Cassava Stems

### Abstract

The aim of this study was the evaluation of the effect of three types of pretreatment (acid, alkaline and organosolv) on the removal of lignin from the biomass of cassava stems. The concentration of solids was 10% (w/v). In the acid treatment acid concentration between 0.79 and 2.21% w/v and time between 8 and 22 minutes, at 121 °C and 15 psi were evaluated. In the alkali treatment NaOH concentration between 0.59 and 3.41% w/v and time between 4 and 11 h, at 60 °C were evaluated; while in the organosolv treatment, ethanol concentration between 41.7 to 98.3% v/v and time between 4 and 11 h at 60 °C were evaluated. Multiple regression analysis was performed taking the reaction time and concentration of the delignifying agent as continuous numerical variables, in order to assess the effect of the method used on the removal of lignin lignocellulosic matrix. Variables with significant influence on the removal of lignin were acid concentration, time and alkali concentration, and time in the organosolv process. The alkaline pretreatment had the highest percentages of lignin removal while the organosolv pretreatment showed lower levels.

*Keywords: cassava stem; lignocellulosics; delignification; biofuels; fermentable sugars*

## INTRODUCCIÓN

El etanol es actualmente el biocombustible más importante (Licht, 2006), cuya producción a partir de azúcares fermentables o almidón, impacta negativamente la economía del proceso, haciéndolo perder competitividad frente a combustibles fósiles, de ahí que los desarrollos tecnológicos estén siendo enfocados a la utilización de materiales lignocelulósicos residuales para disminuir los costos de producción (Taherzadeh y Karimi, 2007; Alvira et al., 2010).

Los materiales lignocelulósicos constituyen la fuente de biomasa renovable más abundante, su producción anual ha sido estimada en  $10^{10}$  MT en todo el mundo (Sánchez y Cardona, 2008). Generalmente son residuos agrícolas, agroindustriales y forestales que pueden presentar en su composición hasta 50 % de celulosa, la cual se encuentra asociada generalmente a otras dos fracciones poliméricas, la lignina y la hemicelulosa (Mussatto et al., 2006).

La lignina es extremadamente resistente a la degradación química, biológica y enzimática, constituyendo una barrera para la utilización de la celulosa en el proceso como hidrólisis enzimática y posterior fermentación (Taherzadeh y Karimi, 2008), por lo cual el pretratamiento del material lignocelulósico se convierte en una etapa esencial para mejorar los rendimientos en la producción de etanol, debido a su impacto sobre la obtención de azúcares fermentables (Alvira et al., 2010). La celulosa está en forma cristalina y amorfa (Taherzadeh y Karimi, 2008), el objetivo del pretratamiento es romper la estructura de la lignina, reducir la cristalinidad de la celulosa, solubilizarla e incrementar la porosidad del material (Mosier et al., 2005), para favorecer la recuperación de azúcares fermentables fundamentales para las etapas posteriores de fermentación (Mosier et al., 2005; Alvira et al., 2010). Se han hecho un gran número de acercamientos para investigar el pretratamiento de una amplia variedad de tipos de materias como es el caso de paja (Sambusiti et al., 2012), paja de arroz (Chen et al., 2010; Chandra et al., 2012), rastrojo de maíz (Zhu et al., 2012; M. Zheng et al., 2010), papel/lodo de pasta (Lin et al., 2009), residuos sólidos municipales (Wang y Wang, 2010; Alqaralleh, 2012), entre otros (Carvalho et al., 2008; Alvira et al., 2010). Se han aplicado a sustratos muy similares a los tallos de yuca como son: materiales leñosos (Li et al., 2010; Mohsenzadeh et al., 2012), tallos de girasol (Monlau et al., 2012), orujo de uva (Chen et al., 2010), racimos vacíos de frutos de palma de aceite (Nieves et al., 2011).

Sin embargo son escasos los trabajos orientados al aprovechamiento de los residuos de yuca, específicamente los tallos y se conoce que el éxito del pretratamiento depende en gran medida del tipo de material lignocelulósico en cuestión (Taherzadeh y Karimi, 2008).

En general, el pretratamiento debe cumplir los siguientes requisitos: a) facilitar la obtención de azúcares fermentables o su disponibilidad para la hidrólisis enzimática, b) evitar la degradación o pérdida de carbohidratos, c) evitar la formación de productos inhibitorios para los procesos siguientes de hidrólisis y fermentación, d) Moderados costos de reducción de tamaño del material lignocelulósico, e) reducir los costos de material para la construcción de reactores para el pretratamiento, f) Consumir poco o nada de químicos (Balat, 2011; Mosier et al., 2005).

Colombia tiene en la yuca una fuente alternativa de biomasa para la producción de bioetanol, su producción en el año 2009 fue de 1.984.427 ton en un área de cultivo de 182.313 Ha (Castaño et al., 2011) y no se cuenta con registros del uso de los residuos de su cultivo, para obtención de etanol. Con base a la distribución porcentual de la biomasa del cultivo de la yuca (50% tubérculo, 40% tallos y 10% Follaje) y a las cifras de producción del tubérculo en el país (Castaño, 2008), se puede estimar una generación anual 1.6 millones de kg de tallos de yuca, una cantidad de biomasa interesante para proyectos de producción de etanol de segunda generación. El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de tres tipos de pretratamiento, sobre la remoción de lignina de la biomasa de tallos de yuca, orientada a posteriores hidrólisis enzimática y fermentación.

## METODOLOGÍA

### *Material lignocelulósico*

Tallos de yuca variedad ICA Copiblanca fueron suministrados por la precooperativa Protacoy ubicada en la región de Urabá. En primera instancia se hizo una disminución de tamaño manualmente para favorecer el posterior secado en estufa a 65°C por 72 horas con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de humedad en el material. Posteriormente, el material se trituró en un molino de martillos y de cuchillas, hasta tamaño < 1,4 mm, y luego se almacenó en bolsas plásticas a 8° C.

*Pretratamiento químico de los materiales*

Se evaluaron tres métodos de pretratamiento químico empleando una carga de sólidos del 10% (p/v), en erlenmeyers de 250 mL, estudiándose el efecto de la concentración del agente deslignificante y el tiempo de reacción sobre el porcentaje de remoción de lignina. Para el pretratamiento ácido se evaluó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a una temperatura de 121°C y 15 psi alcanzada en autoclave. En el pretratamientos alcalino se utilizó NaOH y en el organosolv Etanol como agentes deslignificante, ambos procesos se llevaron a cabo a 60°C en un shaker a 60 rpm. Las concentraciones de agente deslignificante y los tiempos de reacción se emplearon según diseño de experimentos (ver tabla 1).

Tabla 1: Condiciones de los tres pretratamientos evaluados \* T= tiempo, \*\*C= concentración

Alcalino	T (h)*	C (%p/v)**	Acido	T (min)	C (%p/v)**	Organosolv	T (h)	C (%p/v)**
A1	7,50	2,00	H1	20,00	2,00	E1	7,50	70,00
A2	3,96	2,00	H2	10,00	2,00	E2	10,00	50,00
A3	11,04	2,00	H3	7,93	1,50	E3	10,00	90,00
A4	5,00	1,00	H4	15,00	2,21	E4	5,00	90,00
A5	10,00	1,00	H5	15,00	1,50	E5	7,50	70,00
A6	10,00	3,00	H6	15,00	0,79	E6	7,50	70,00
A7	7,50	0,59	H7	15,00	1,50	E7	7,50	70,00
A8	5,00	3,00	H8	22,07	1,50	E8	11,04	70,00
A9	7,50	2,00	H9	10,00	1,00	E9	5,00	50,00
A10	7,50	3,41	H10	20,00	1,00	E10	7,50	41,72
A11	7,50	2,00	H11	15,00	1,50	E11	3,96	70,00
A12	7,50	2,00	H12	15,00	1,50	E12	7,50	70,00
A13	7,50	2,00	H13	15,00	1,50	E13	7,50	98,28

Al final de la reacción, el material pretratado se filtró, se tomaron muestras de la fracción líquida y la torta en el filtro, la cual fue lavada hasta pH neutro y secada a 65° C durante 12 horas. Para evaluar la efectividad de los pretratamientos se determinó el porcentaje de remoción de lignina mediante la ecuación 1:

$$\% \text{ lignina removida} = \frac{\text{lignina alimentada} - \text{lignina recuperada}}{\text{lignina alimentada}} \times 100 \quad (1)$$

*Análisis del material lignocelulósico*

A los tallos de yuca y a las fracciones sólidas resultantes de cada pretratamiento se les determinó el contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa mediante el uso de los métodos de Van Soest, a través de la determinación de los parámetros FDA (Fibra Detergente Acida), FDN (Fibra detergente Neutra) y Lignina. Es necesario resaltar el hecho que los valores de concentración de Celulosa y hemicelulosa determinadas a partir de los datos de FAD, FDN y Lignina, son aproximaciones a las concentraciones reales. Los contenidos de hemicelulosa y celulosa fueron calculados como la diferencia entre FDN y FDA; y FDA y lignina respectivamente.

*Microscopia electrónica de barrido (SEM)*

Con el objetivo de evaluar visualmente el estado en que quedaba cada muestra después del pretratamiento, se aplicó el análisis de Microscopia Electrónica de barrido (SEM), el cual fue desarrollado utilizando un JEOL JSM6490LV con un voltaje de aceleración de 20 kV. Previamente a la obtención de imágenes, las muestras fueron secadas y ubicadas en una cinta de doble cara de carbono, recubiertas con aproximadamente 120-150 nm de Au mediante pulverización catódica.

*Análisis y modelamiento de los datos*

Se utilizó el software STATGRAPHICS Centurión XVI para ajustar los datos experimentales a un polinomio de segundo orden de la forma de la ecuación (2), en el cual se incluyeron solamente los términos estadísticamente significativos, según el método de eliminación backward para obtener los coeficientes.

$$y = \beta_0 t + \beta_1 C + \beta_2 tC + \beta_3 t^2 + \beta_4 C^2 \quad (2)$$

Donde  $y$  es el porcentaje de remoción de lignina,  $t$  es el tiempo de reacción,  $C$  es la concentración del agente deslignificante y  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  y  $\beta_4$  son los coeficientes de ajustes del modelo para los términos lineales, interacciones y cuadráticos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización del Material

La composición porcentual en base seca de los tallos de yuca molidos fue de 11,8% de lignina, 38,8% de celulosa y 7,2% de hemicelulosa. La lignina es el segundo componente más abundante en el material, lo que justifica su remoción de la estructura de los tallos de yuca. El contenido de celulosa de la biomasa de tallo de yuca es similar al reportado por otros autores (Martín et al., 2006; Martín et al., 2007; Han et al., 2011), mientras que hay diferencia en los contenidos de lignina y hemicelulosa. Estas diferencias se pueden explicar con base en las diferencias en las variedades y en el estado vegetativo usado.

### Pretratamiento Acido

En la tabla 2 se reporta el contenido de lignina, hemicelulosa, celulosa y los porcentajes de remoción de lignina de los tallos de yuca pretratados en la fracción sólida posterior al pretratamiento ácido. Se aprecia que el pretratado posee altos contenidos de celulosa en concentraciones que varían del 66-75% y el contenido de hemicelulosa disminuyeron (1,4-4,6%) en comparación con los tallos de yuca sin pretratar, lo que puede deberse a que la hemicelulosa tiene una estructura ramificada aleatoria y amorfa, con poca resistencia a la hidrólisis, por lo que es más fácilmente hidrolizada por ácido (Saha et al., 2005; Taherzadeh y Karimi, 2008) mientras que la celulosa es un polímero lineal de glucosa, hecha de unidades de celobiosa, y sus cadenas están unidas por enlaces de hidrógeno en estructuras llamadas "primarias y microfibrillas", las cuales están organizadas en fracciones cristalina y amorfa, configuración que la hace más resistente al ataque ácido (Taherzadeh y Karimi, 2008).

Tabla 2: Análisis de las muestras provenientes del pretratamiento ácido. \*R.L: remoción de lignina

Ensayo	FDA	FDN	Lignina	Hemicelulosa	Celulosa	% R. L*
H1	84,6	89,2	15,8	4,6	68,8	22,59
H2	86,2	88,2	15,7	2	70,5	21,51
H3	82,5	84,4	13,8	1,9	68,7	25,66
H4	86,4	88,2	16,4	1,8	70	20,73
H5	89,4	90,8	14	1,4	75,4	31,19
H6	81,3	84,4	15,2	3,1	66,1	20,43
H7	87,6	90,3	15,7	2,7	71,9	22,16
H8	88,6	91,3	14,3	2,7	74,3	27,93
H9	84,4	87,2	12,2	2,8	72,2	36,95
H10	84,3	89,1	11,3	4,8	73	41,51
H11	86,2	89,6	14,2	3,4	72	31,12
H12	88,6	90,9	14,1	2,3	74,5	32,46
H13	85,3	88,8	17,3	3,5	68	17,81

En el caso de la lignina se trata de una molécula muy compleja constituida de unidades de fenilpropano enlazadas en una estructura tridimensional, que la hacen el más recalcitrante componente de la pared celular de las plantas y el más resistente a la degradación química o enzimática, por lo que es el componente que presenta más problemas a la hora de usar los materiales lignocelulósicos en fermentación (Taherzadeh y Karimi, 2008), por esta razón se enfocó el esfuerzo en reducir la cantidad de lignina en los tallos de yuca objeto de estudio, obteniendo como resultado el modelo que se presenta en la ecuación 3, que según el  $R^2$  explica el 94,94% de la variabilidad en el porcentaje de remoción de lignina.

$$\%RL = 46.2C_H + 17.33C_H^2 \quad (3)$$

En esta ecuación,  $C_H$  es la concentración de  $H_2SO_4$ , % p/v.

Tabla 3: Análisis de regresión para el modelo pretratamiento ácido en la remoción de lignina (RL). \*SC: Suma de cuadrados, # GI: Grados de libertad \*\*CM: Cuadrado medio

Parámetro	Estimación	Error Estándar	T	Valor-P	
$C_H$	46,2	5,82938	7,92536	0,0000	
$C_H^2$	-17,6335	3,36727	-5,23673	0,0003	
Análisis de Varianza					
Fuente	SC*	GI#	CM**	Razón-F	Valor-P
Modelo	9636,89	2	4818,45	103,26	0,0000
Residuo	513,303	11	46,6639		
Total	10150,2	13			

En la figura 1 se muestra los residuos del modelo del pretratamiento ácido contra la remoción de lignina predicha. Los residuos están aleatoriamente distribuidos y no muestran tendencia alguna indicando una buena predicción de la remoción de lignina con varianza constante y la adecuación del modelo.

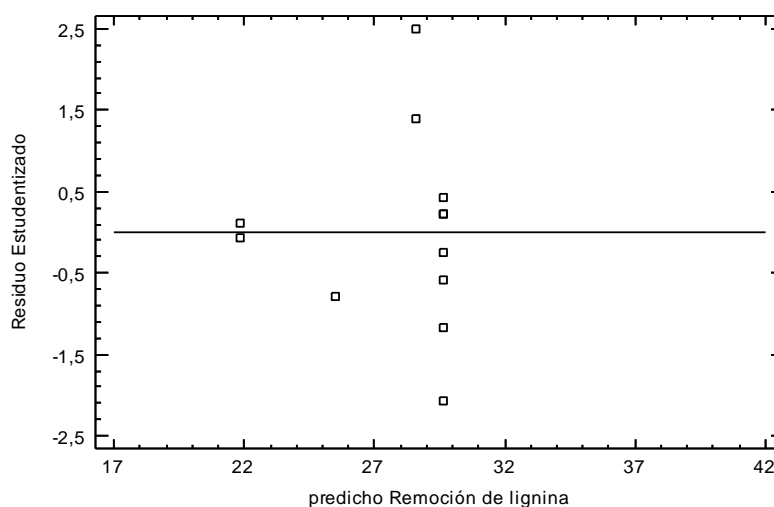


Fig. 1: Análisis de residuos pretratamiento ácido

En la ecuación 3 y en la tabla 3, se observa que la concentración de ácido  $C_H$ , tiene efecto significativo sobre la cantidad de lignina removida (RL), resultado similar a lo reportado en la eliminación de lignina en tallos de algodón (Silverstein et al., 2007) y papel periódico (Hendriks y Zeeman, 2009). Sin embargo, en el trabajo realizado por Martin et al., en 2007 este pretratamiento resultó ser ineficiente para tallos de yuca.

Por otro lado es conocido que tanto la concentración como la naturaleza del ácido usado tienen efectos importantes sobre la cantidad de lignina que se remueve (Taherzadeh y Karimi, 2007). Casi el 100 % de la hemicelulosa puede ser removida por un pretratamiento con ácido diluido, sin embargo este pretratamiento no es eficiente en la disolución de la lignina, pero puede fragmentarla y de esa forma facilitar la hidrólisis enzimática de la celulosa (Yang y Wyman, 2004). De hecho el tratamiento con ácido diluido ha sido ampliamente utilizado por los buenos rendimientos en la obtención de azúcares fermentables y por ende mayores rendimientos de etanol (Han et al., 2011).

Tabla 4: Análisis de regresión para el modelo pretratamiento ácido en la remoción de lignina (RL). \*SC: Suma de cuadrados, # GI: Grados de libertad \*\*CM: Cuadrado medio

Parámetro	Estimación	Error Estándar	T	Valor-P	
$C_H$	46,2	5,82938	7,92536	0,0000	
$C_H^2$	-17,6335	3,36727	-5,23673	0,0003	
Análisis de Varianza					
Fuente	SC*	GI#	CM**	Razón-F	Valor-P
Modelo	9636,89	2	4818,45	103,26	0,0000
Residuo	513,303	11	46,6639		
Total	10150,2	13			

*Pretratamiento Alcalino*

En la tabla 4 se reporta el contenido de lignina, hemicelulosa, celulosa y los porcentajes de remoción de lignina de los tallos de yuca pretratados en la fracción sólida posterior al tratamiento alcalino. Se observa que hay reducción de la celulosa (RC), aumento de la hemicelulosa (RH) y de la lignina (RL). La reducción de la celulosa puede propiciar que esta incremente su fracción cristalina, ya que se ha observado que este pretratamiento puede tener ese efecto, lo cual no necesariamente es negativo para la etapa de fermentación (Kim y Holtzaple, 2006).

Tabla 5: Análisis de las muestras provenientes del pretratamiento alcalino

Ensayo	FDA	FDN	Lignina	Hemicelulosa	Celulosa	% R. L*
A1	70,2	84,8	14,7	14,6	55,5	37,19
A2	70,2	81,8	15	11,6	55,2	30,91
A3	68,7	81,3	12,2	12,6	56,5	44,41
A4	68	82,4	13	14,4	55	33,95
A5	62	77,7	11,1	15,7	50,9	39,27
A6	71	79,8	15,1	8,8	55,9	32,20
A7	60,9	77,2	12,3	16,3	48,6	30,18
A8	69,5	79,1	12,4	9,6	57,1	41,60
A9	72	80,9	16,2	8,9	55,8	27,10
A10	71,9	81,8	14,7	9,9	57,2	39,71
A11	71,6	84,2	12,7	12,6	58,9	41,47
A12	71,2	82,3	12,7	11,1	58,5	43,41
A13	72,1	81,6	15	9,5	57,1	31,12

La ecuación de regresión ajustada (4) optimizando paso a paso hacia atrás, explica el 98,36% de la variabilidad en el porcentaje de remoción de lignina. Los resultados del ANOVA (tabla 5) muestran que en los intervalos evaluados, el tiempo de reacción y la concentración de NaOH, tienen un efecto significativo sobre el porcentaje de remoción de lignina, presentando efecto tanto en forma lineal como en forma de interacción entre las dos variables. El efecto de la concentración de NaOH sobre la remoción de lignina ya ha sido reportado en el pretratamiento de diferentes sustratos lignocelulósicos como son: tallos de algodón, materiales leñosos y tallos de girasol (Silverstein et al., 2007; Li et al., 2010; Mirahmadi et al., 2010; Mohsenzadeh et al., 2012; Monlau et al., 2012; Salehian y Karimi 2013). Sin embargo es notoria la ausencia de trabajos en los que se haya evaluado el efecto de este tratamiento sobre tallos de yuca, lo cual pone de manifiesto la relevancia a los resultados del presente trabajo.

$$\%RL = 4.34t_a + 15.07C_a - 1.76t_a C_a \quad (4)$$

Donde  $t_a$ , es el tiempo de reacción en horas y  $C_a$  es la concentración de NaOH, % p/v.

Tabla 6: Análisis de Varianza para el modelo pretratamiento alcalino

Parámetro	Estimación	Error Estándar	T	Valor-P	
$t_a$	4,34081	0,529367	8,20001	0,0000	
$C_a$	15,0709	2,77063	5,43952	0,0003	
$t_a * C_a$	-1,75914	0,428095	-4,10922	0,0021	
ANÁLISIS DE VARIANZA					
Fuente	SC	GI	CM	Razón-F	Valor-P
Modelo	17279,6	3	5759,86	199,93	0,0000
Residuo	288,089	10	28,8089		
Total	17567,7	13			

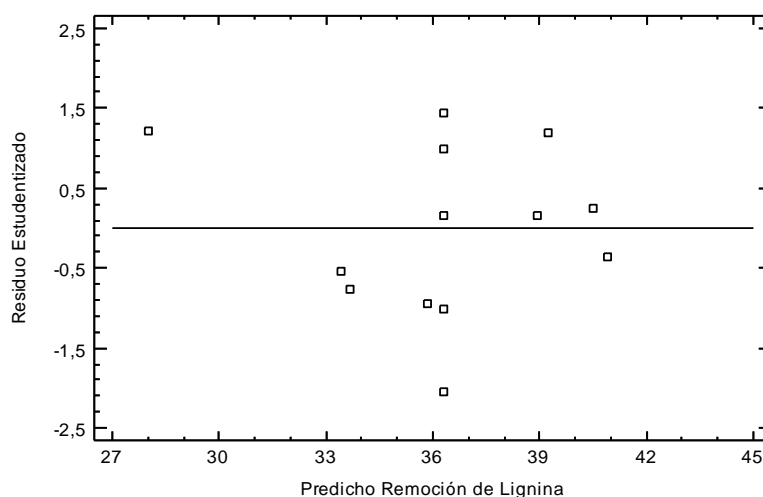


Fig. 2: Análisis de residuales pretratamiento alcalino

En la figura 2 se muestra los residuos del modelo del pretratamiento alcalino contra la remoción de lignina predicha. Los residuos están aleatoriamente distribuidos y no muestran tendencia alguna indicando una buena predicción de la remoción de lignina con varianza constante y la adecuación del modelo.

Con el pretratamiento alcalino se obtienen los más altos valores de remoción de lignina con respecto a los pretratamientos realizados en este estudio, lo que puede ser atribuido a que el ion  $\text{Na}^+$  tiene un diámetro suficientemente pequeño como para penetrar los poros más pequeños de la matriz lignocelulósica y a su mayor capacidad oxidativa sobre los enlaces éster y éter de la lignina (Torres, 2009). Estudios de pretratamientos reportan que cambios en la concentración de NaOH causan un efecto significativo sobre la remoción de lignina en distintos materiales lignocelulósicos (Gómez et al., 2013; Alvira et al., 2010; Carvalheiro et al., 2008 Silverstein et al., 2007). En la literatura se han reportado mayores porcentajes de remoción de lignina a los alcanzados en este estudio, como es el caso de Silverstein et al., 2007, quienes alcanzaron 60 %, aplicando a tallos de algodón, tratamientos alcalinos, sin embargo ellos usaron condiciones más drásticas (65.63% para 2% NaOH, 90 min, 121 °C/15 psi). Igual es el caso de Salehian y Karimi, en 2013, que pasaron de 25% a 85% en RL en tratamiento alcalino de Pino y el de Mirahmadi et al., en 2010, los cuales en ambos casos pueden atribuirse a la naturaleza diferente del sustrato y a la utilización de concentraciones de NaOH mayores al 10%, factor que en este estudio fue limitada al 3,41%.

Tabla 7: Análisis de las muestras provenientes del pretratamiento organosolv

Ensayo	FDA	FDN	Lignina	Hemicelulosa	Celulosa	% R.L.
E1	63,8	77,1	14,2	13,3	49,6	3,93
E2	63	76,1	12,7	13,1	50,3	14,27
E3	63,7	75,5	11,5	11,8	52,2	22,60
E4	61,8	75,2	12,8	13,4	49	14,90
E5	64,4	76,2	11,6	11,8	52,8	22,03
E6	62,5	75,3	12	12,8	50,5	20,50
E7	63,7	80,5	13,1	16,8	50,6	14,53
E8	61,8	74,8	12,9	13	48,9	10,35
E9	62,4	76,6	11,8	14,2	50,6	22,70
E10	62	76,5	11	14,5	51	26,94
E11	61,8	73,5	11,7	11,7	50,1	19,30
E12	61,7	74	12	12,3	49,7	18,11
E13	61,3	72,2	11,4	10,9	49,9	22,05

### Pretratamiento Organosolv

En la tabla 6 se reportan los porcentajes de remoción de lignina y composición de la fracción lignocelulósica de los tallos una vez se han pretratado con etanol, siendo los porcentajes de remoción de lignina los más bajos entre los tres pretratamientos estudiados. La concentración de etanol como agente deslignificante, en las condiciones ensayadas, no tuvo efecto importante en la remoción de lignina de la biomasa de tallos de yuca, mientras que el tiempo de reacción sí, como se puede apreciar en la ecuación de regresión optimizada (5) que explica el 90,58% de la variabilidad en la remoción de lignina (ver tabla 7).

$$\%RL = 5.68t_0 - 0.41t_0^2 \quad (5)$$

Donde  $t_0$  es el tiempo de reacción del proceso organosolv.

Esto indica que el etanol tuvo poco efecto sobre la solubilización de la hemicelulosa y celulosa, no obstante no es un agente que permita lixiviar la lignina de la matriz del sustrato. En la figura 3 se muestra los residuos del modelo del pretratamiento organosolv contra la remoción de lignina predicha. Los residuos están aleatoriamente distribuidos y no muestran alguna tendencia indicando una buena predicción de la remoción de lignina con varianza constante y la adecuación del modelo.

Tabla 8: Análisis de Varianza para el modelo pretratamiento organosolv

Parámetro	Estimación	Error Estándar	T	Valor-P	
$t_0$	5,68141	1,0745	5,28748	0,0003	
$t_0^2$	-0,41271	0,124178	-3,32354	0,0068	
Análisis de Varianza					
Fuente	SC	Gl	CM	Razón-F	Valor-P
Modelo	4182,08	2	2091,04	52,88	0,0000
Residuo	435,015	11	39,5468		
Total	4617,09	13			

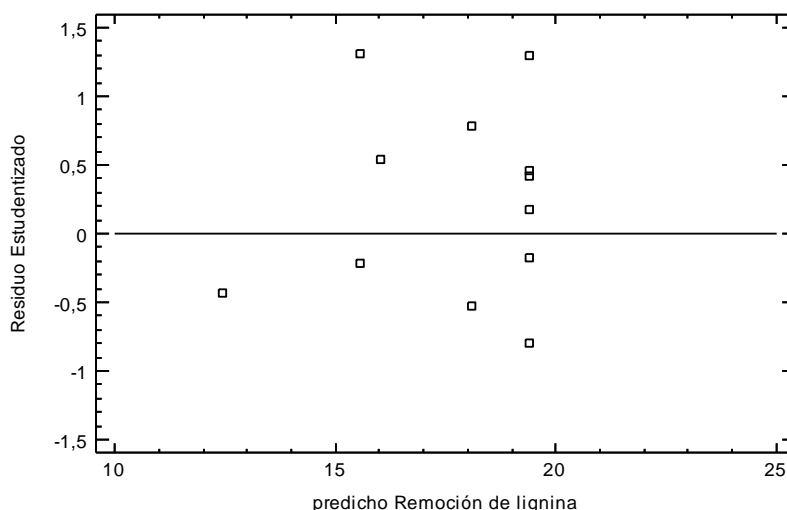


Fig. 3: Análisis de residuos pretratamiento organosolv

A pesar de que los valores de RL obtenidos con el pretratamiento organosolv son menores que los de los otros dos, se debe tener en cuenta la buena conversión a glucosa que se puede obtener de la celulosa obtenida por este pretratamiento, sin importar la presencia de lignina residual (Pang et al., 2008).

### Microscopía Electrónica SEM

En la figura 4 se presentan imágenes para los tallos de yuca tratados y sin pretratar con magnificaciones de 250x. A partir de esta figura se observa microscópicamente como la estructura de la superficie de la biomasa pretratada (figura 4 b, c y d) es alterada al ser comparada con la muestra sin pretratamiento (figura 4a), de igual manera se resalta que algunos de los componentes de las paredes celulares vegetales se solubilizan y precipitan sobre las paredes que se conservan de materiales lignocelulósicos luego del pretratamiento. La estructura observada en la figura 4a, corresponde al tallo de yuca sin pretratar, como queda después del proceso de molienda.

Estas imágenes también indican una diferencia entre la muestra según el tipo de pretratamiento recibido, y con la muestra sin ningún pretratamiento. En la figura 4a, se puede apreciar como el material sin pretratamiento tiene una especie de cobertura que va desapareciendo a medida que los pretratamientos son más exitosos en la reducción de la cantidad de lignina, iniciando en organosolv, pasando por ácido, hasta llegar a alcalino, con lo cual se puede concluir que dicho material está conformado principalmente por lignina. Es de esperarse que las fibras alargadas que se observan en la figura 4d, correspondan a celulosa, por lo que la posibilidad de que esta sea alcanzada por enzimas o ácidos en un proceso de hidrólisis, es más factible



en el caso de la figura 4d, la cual corresponde al material pretratado por el tratamiento alcalino. Estos resultados se corresponden con otros de la literatura, en los cuales el pretratamiento alcalino presentó el mayor porcentaje de remoción de lignina y menores porcentajes de solubilización de celulosa y hemicelulosa (Cardona et al., 2013; Carvalheiro et al., 2008), lo cual es muy favorable.

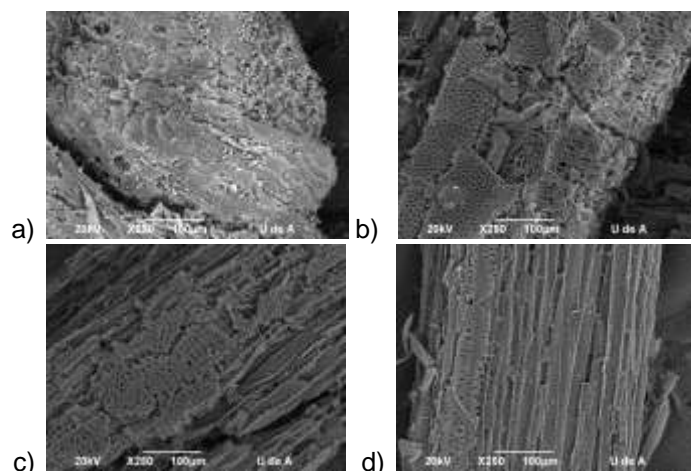


Fig. 4. Imágenes SEM de la biomasa de tallos de yuca. a) sin pretratar, b) pretratada organosolv, c) pretratado ácido, d) pretratado alcalino.

## CONCLUSIONES

El pretratamiento alcalino es el método que removió mayor cantidad de lignina comparado con los dos métodos restantes, siendo la concentración de NaOH el factor más influyente. El efecto principal del pretratamiento ácido fue solubilizar la hemicelulosa, siendo la concentración de ácido el factor más influyente sobre este componente. El proceso Organosolv presentó los más bajos valores de remoción de lignina siendo el menos efectivo para este propósito en las condiciones ensayadas; el factor más influyente para este proceso fue el tiempo de reacción, mostrando así que en las condiciones estudiadas el etanol no tiene efectividad significativa en la remoción de la lignina.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo dan los agradecimientos al Politécnico Colombiano Jaime Isaza y a la Universidad de Antioquia por el apoyo financiero a través del proyecto No. 2061100144, así como al Comité para el Desarrollo de la Investigación en la Universidad de Antioquia (CODI) con su Estrategia de Sostenibilidad 2014/2015.

## REFERENCIAS

- Alqaralleh, R. M., Effect of alkaline pretreatment on anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste, Master Tesis, Ottawa: University of Ottawa (2012).
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., y Negro, M.J., Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review, doi:10.1016/j.biortech.2009.11.093, *Bioresource Technol.* 101(13), 4851–4861 (2010).
- Alqaralleh, R. M., Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review, doi:10.1016/j.enconman.2010.08.013, *Energy Convers Manage.* 52(2), 858–875 (2011).
- Cardona, E.M., Rios, J.A., Peña, J.D., y Rios, L.A., Pretratamiento Alcalino de Pasto Elefante (*Pennisetum sp*) y King Grass (*Pennisetum hybridum*) Cultivados en Colombia para la Producción de Bioetanol, doi: 10.4067/S0718-07642013000500009, *Información tecnológica.* Vol. 24(5), 69-80 (2013).
- Carvalheiro, F., L.C. Duarte y F.M. Gírio, Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments, *J. Sci. Ind. Res. India*, 67, 849-864 (2008).
- Botero J., H. Castaño y C. Naranjo, Life Cycle Assessment for Bioethanol production from cassava in Colombia, *Memorias de la IV Conferencia Internacional de Análisis de Ciclo de Vida.* México: Instituto de Ingeniería UNAM 6(2), 69-67 (2011).

- Castaño, H.I., La yuca como alternativa para la producción de alcohol carburante, *Politécnica*. 6, 25-38 (2008)
- Chandra, R., Takeuchi, H. y Hasegawa, T., Hydrothermal pretreatment of rice straw biomass: A potential and promising method for enhanced methane production, doi:10.1016/j.apenergy.2012.01.027, *Appl Energ.* 94, 129–140 (2012).
- Chen, G.Y., Z. Zheng, Y. Luo, X.X. Zou y C.X. Fang, Effect of alkaline treatment on anaerobic digestion of rice straw, *Huan jing ke xue*, 31(9), 2208-2213 (2010).
- Gómez, E.A., L.A. Ríos y J.D. Peña, Efecto del pretratamiento de biomasa maderera en el rendimiento de etanol. *Información Tecnológica* 24(5), 113-122 (2013).
- Han, M., Kim, Y., Kim, Y., Chung, B. y Choi, G.W., Bioethanol production from optimized pretreatment of cassava stem, doi: 10.1007/s11814-010-0330-4, *Korean J Chem Eng*, 28(1), 119-125 (2011).
- Hendriks, A. T. W. M., y Zeeman, G., Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, doi:10.1016/j.biortech.2008.05.027, *Bioresource Technol.* 100 (1), 10–18 (2009).
- Kim, S. y Holtzapple M.T., Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover, doi:10.1016/j.biortech.2005.03.040, *Bioresource Technol.* 97(4), 583–591 (2006).
- Li, L., Yang, X., Li, X., Zheng, M., Chen, J. y Zhang, Z., The Influence of Inoculum Sources on Anaerobic Biogasification of NaOH-treated Corn Stove, doi:10.1080/15567030902937192, *Energy Source Part A*. 33(2), 138-144 (2010).
- Licht, F.O., *World ethanol markets: the outlook to 2015, Agra Europe special report: Tunbridge Wells* (2006)
- Lin, Y., Wang, D., Wu, S. y Wang, C., Alkali pretreatment enhances biogas production in the anaerobic digestion of pulp and paper sludge, doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.04.086, *J Hazard Mater.* 170(1), 366–373 (2009).
- Martín, C., Y. López, Y. Plasecia y E. Hernandez, Characterisation of Agricultural and Agro-Industrial Residues as Raw Materials for Ethanol Production, *Chem Biochem Eng Q.* 20(4), 443-447 (2006).
- Martin, C., Alriksson, B., Sjöde, A., Nilvebrant, N.O. y Jönsson, L.J., Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production, doi: 10.1007/s12010-007-9063-1, *Appl Biochem Biotech.* 137-140(1-12), 339-352 (2007).
- Mirahmadi, K., M.M Kamir, A. Jeihanipour, A. Karimi y M. Taherzadeh, Alkaline pretreatment of spruce and birch to improve bioethanol and biogas production, *BioResources*, 5(2), 928-938 (2010).
- Mohsenzadeh, A., Jeihanipour, A., Karimi, K., y Taherzadeh, M.J., Alkali pretreatment of softwood spruce and hardwood birch by NaOH/thiourea, NaOH/urea, NaOH/urea/thiourea, and NaOH/PEG to improve ethanol and biogas production, doi: 10.1002/jctb.3695, *J. Chem Technol Biot.* 87(8), 1209–1214 (2012).
- Monlau, F., Barakat, A., Steyer, J.P. y Carrere H., Comparison of seven types of thermo-chemical pretreatments on the structural features and anaerobic digestion of sunflower stalks, doi: 10.1016/j.biortech.2012.06.040, *Bioresource Technol.* 120, 241–247 (2012).
- Mosier, N., Wyman C.E., Dale B.D., Elander R.T., Lee Y.Y., Holtzapple, M. y Ladisch., C.M., Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, doi:10.1016/j.biortech.2004.06.025, *Bioresource Technol.* 96(6), 673–686 (2005).
- Mussatto, S., G. Dragone, M. Fernandes, G. Rochan y I. Robert, Efecto de los tratamientos de hidrólisis ácida e hidrólisis alcalina en la estructura del bagazo de malta para liberación de fibras de celulosa, XXII Interamerican Confederation of Chemical Engineering. V. Asociación Argentina de Ingenieros Químicos, (2006).
- Nieves, D.C., Karimi K. y Horváth I.S., Improvement of biogas production from oil palm empty fruit bunches (OPEFB), doi:10.1016/j.indcrop.2011.03.022, *Ind Crop Prod.* 34(1), 1097–1101 (2011).
- Pang, Y.Z., Liu, Y.P., Li, X.J., Wang, K.S. y Yuan, H.R., Improving biodegradability and biogas production of corn stover through sodium hydroxide solid state pretreatment, doi: 10.1021/ef800001n, *Energy Fuels.* 22(4), 2761–2766 (2008).

- Saha, B.C., Iten, L.B., Cotta, M.A., y Wu, Y.V., Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol, doi: 10.1021/bp049564n, *Biotechnol Progr.* 21(3), 816-822 (2005).
- Salehian, P. y Karimi K., Alkali pretreatment for improvement of biogas and ethanol production from different waste parts of pine tree, doi: 10.1021/ie302805c, *Ind. Eng. Chem. Res* 52(2), 972–978 (2013).
- Sambusiti, C., Ficara, E., Rollini, M., Manzoni, M. y Malpei, F., Sodium hydroxide pretreatment of ensiled sorghum forage and wheat straw to increase methane production, doi: 10.2166/wst.2012.480, *Water Sci Technol.* 66(11), 2447–2452 (2012).
- Sánchez, Ó.J. y Cardona, C.A., Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, doi:10.1016/j.biortech.2007.11.013, *Bioresource Technol.* 99(13), 5270–5295 (2008).
- Silverstein, R.A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R.R., Boyette, M.D. y Osborne, J. A., comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks, doi:10.1016/j.biortech.2006.10.022, *Bioresource Technol.* 98(16), 3000–3011 (2007).
- Taherzadeh, M.J. y K. Karimi, Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review, *BioResources* 2. 472-499 (2007).
- Taherzadeh, M.J. y Karimi K., Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review, doi: 10.3390/ijms9091621, *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1621-1651 (2008).
- Torres J.D., Estudio del proceso de conversión de materiales lignocelulósicos para la producción de azúcares fermentables, Tesis magíster Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia, Colombia (2009).
- Wang, H.J. y H. Wang, Alkaline hydrothermal pretreatment for the increase in biodegradability of leaves waste, Edited by Hao J.M., J.H Li y H.L. Hu, Selected proceedings of the fifth international conference on waste management and technology (ICWMT 5), 166-169. Irvin, California: Sci. Res Publ, Inc-Srp (2010).
- Yang, B. y Charles E.W., Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose, doi: 10.1002/bit.20043, *Biotechnol Bioeng.* 86(1), 88-98 (2004).
- Zheng, M., Li, L., Li, X., Xiong, J., Mei, T. y Chen, G., The Effects of Alkaline Pretreatment Parameters on Anaerobic Biogasification of Corn Stover, doi: 10.1080/15567030902937119, *Energ Source Part A.* 1918-1925 (2010).
- Zhu, J., Wan, C. y Li, Y., Enhanced solid-state anaerobic digestion of corn stover by alkaline pretreatment, doi:10.1016/j.biortech.2010.04.060, *Bioresource Technol.* 101(19), 7523–7528 (2012).

