

Extracción y caracterización de lignina proveniente de la cáscara de cacao utilizando solventes
eutéticos profundos

Iveth Vanessa Ayala Viloría

Trabajo de Grado para Optar el Título de Química

Director

Cristian Blanco Tirado

Ph.D. Química

Codirector

Sergio Andrés Ovalle Serrano

Ph.D. Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2022

Dedicatoria

A Dios, Él me eligió y a Él le entrego el honor.

A mis padres, este logro es fruto del sacrificio que hicieron día a día por apoyar mis metas, reconozco que en este proceso sus manos estuvieron involucradas constantemente y que más allá de su incansable apoyo, hicieron que cada paso se sintiera un poco más dulce y suave, gracias por tanto amor.

A mi novio, compañero y mejor amigo, por su esfuerzo en hacer cada carga más liviana y cada día más brillante. Por su apoyo, motivación, enseñanza y por las decisiones que durante estos años fueron claves para impulsar mi carrera.

A mi familia, que siempre estuvo alentándome y apoyándome. En especial a Joely, por sus chocolates en días de llanto y a Alena, por ser fuente de paz y alegría cuando sentía decaer.

Agradecimientos

A Dios, por darme la oportunidad de realizar este proceso de formación. Por demostrarme cada día su amor y fidelidad.

A Alexander Herrera y Andrea Sandoval, porque fueron la guía que necesitaba para desestancar mis ruedas.

A Sergio Ovalle, por su disposición y dedicación, por todo el apoyo, la guía y la enseñanza en cada parte de este proceso.

Al profesor Cristian Blanco, por su orientación académica y por brindarme la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación.

A todos los integrantes del grupo de investigación GIFTEX por su constante apoyo.

Al Parque Tecnológico Guatigará y al laboratorio de Rayos X de la Universidad Industrial de Santander por sus servicios, el aporte de equipos e infraestructura.

A la Universidad Industrial de Santander y la Escuela de Química por otorgarme el privilegio de ser parte de su comunidad universitaria y brindar un sustancial proceso de formación.

Tabla de contenido

Introducción	14
1. Objetivos	16
1.1 Objetivo General	16
1.2 Objetivos específicos	16
2. Marco teórico	17
2.1 Generalidades del cacao.....	17
2.2 Composición de la materia vegetal	20
2.3 Lignina	22
2.3.1 Grupos funcionales	24
2.3.2 Tipos de uniones	26
2.4 Métodos convencionales de extracción de lignina.....	30
2.4.1 Método sulfito	30
2.4.2 Método Kraft.....	30
2.4.3 Método de extracción con peróxido de hidrógeno.....	31
2.5 Solventes Eutécticos Profundos	32
2.5.1 Selectividad de los solventes eutécticos profundos	35
2.6 Comparación entre métodos de extracción de lignina	36
3. Antecedentes	37
4. Metodología	40
4.1 Materiales y reactivos	40

EXTRACCIÓN DE LIGNINA UTILIZANDO DES	5
4.2 Pretratamiento y desencerado de la cáscara de cacao	40
4.3 Extracción de lignina con el uso de DES	40
4.3.1 Síntesis del DES	40
4.3.2 Extracción de lignina	41
4.3.3 Análisis cuantitativo de lignina en la cáscara de cacao deslignificada	44
4.4 Extracción de lignina con H ₂ O ₂	44
4.5 Caracterización	45
4.5.1 Difracción de Rayos X (DRX)	45
4.5.2 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)	46
4.5.3 Análisis Termogravimétrico (TGA)	46
4.5.4 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS)	46
5. Resultados	48
5.1 Extracción de lignina con el uso de DES	48
5.1.1 Síntesis del DES	48
5.1.2 Extracción de lignina	48
5.1.2.1 Rendimientos de extracción	49
5.1.3 Rendimiento de deslignificación	54
5.2 Extracción de lignina con H ₂ O ₂	55
5.3 Caracterización	56
5.3.1 Difracción de Rayos X (DRX)	56
5.3.2 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)	59
5.3.2.1 Lignina extraída implementando DES	59
5.3.2.2 Lignina extraída implementando H ₂ O ₂	65

EXTRACCIÓN DE LIGNINA UTILIZANDO DES	6
5.3.2.3 Lignina comercial.	66
5.3.3 Análisis Termogravimétrico (TGA)	67
5.3.4 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS).....	72
6. Conclusiones.....	75
7. Recomendaciones	76
Referencias.....	77
Apéndices.....	82

Lista de tablas

Tabla 1. Componentes del fruto del cacao.....	19
Tabla 2. Composición química de la cáscara de cacao.....	21
Tabla 3. Comparación entre métodos de extracción de lignina.....	36
Tabla 4. Condiciones para la formación de DES.....	41
Tabla 5. Condiciones para la extracción de lignina con DES.....	42
Tabla 6. Rendimientos de extracción de lignina con DES AL-A, AL-H y AL-P, a partir de cada experimento.....	50
Tabla 7. Impacto de las variables estudiadas ante el rendimiento de extracción.....	52
Tabla 8 Índice de cristalinidad tomados a partir de los difractogramas de Rayos X.....	59
Tabla 9. Asignación de señales significativas del espectro FT-IT, de AAL, AHL y APL.....	62

Lista de figuras

Figura 1. Fruto del cacao	18
Figura 2. Estructura de la composición de la materia vegetal	20
Figura 3. Estructuras de los compuestos monoméricos de la lignina, presentado en forma de monolignoles y como unidades del polímero	23
Figura 4. Esquema de la biosíntesis de la lignina por medio de la ruta fenilpropanoide.....	25
Figura 5. Uniones tipo éter y carbono-carbono entre los monómeros de la lignina	26
Figura 6. Tipos de uniones entre la lignina y la hemicelulosa.....	28
Figura 7. Modelo del polímero de lignina propuesto por Brunow y Boerjan. (A) Estructura con unidades guayacilo. (B) Estructura con unidades guayacilo y sirinilo	29
Figura 8. Diagrama de fase de una mezcla de compuestos formando un DES	32
Figura 9. Estructuras de compuestos formadores de DES	33
Figura 10. Muestra de DES AL-H.....	48
Figura 11. Soluciones generadas a partir del tratamiento con AL-H y la adición de agua-etanol (1:1). En orden de izquierda a derecha experimento 8, 4 y 3	49
Figura 12. Superficie de respuesta estimada para el rendimiento de extracción en base a las variables de relación sólido-líquido y tiempo.....	53
Figura 13. Tendencias del rendimiento de extracción ante la influencia de las variables estudiadas	54
Figura 14. Perfiles de Difracción de Rayos X de cáscara de cacao desencerada (CDesencerada), cáscara de cacao deslignificada con DES AL-A (CAlanina), cáscara de cacao deslignificada con	

DES AL-H (CHistidina), cáscara de cacao deslignificada con DES AL-P (CProlina), cáscara de cacao deslignificada con H₂O₂ (CPeróxido) y la lignina extraída con DES AL-P (APL) 57

Figura 15. Espectros IR de la lignina extraída usando los DES AL-A (AAL), AL-H (AHL) y AL-P (APL) en un rango de número de onda de (a) 3700-600 cm⁻¹ y (b) 1850-600 cm⁻¹ 61

Figura 16. Comparación entre los espectros IR de la cáscara desencerada, la lignina extraída y la cáscara de cacao deslignificada con cada uno de los tipos de DES (AL-A, AL-H y AL-P) 64

Figura 17. Espectro IR de la lignina obtenida mediante el tratamiento con H₂O₂..... 66

Figura 18. Espectro IR de la lignina comercial..... 67

Figura 19. Curvas de degradación térmica (TGA y DTG) de AAL, AHL y APL, lignina extraída mediante el uso de H₂O₂ y comercial 70

Figura 20. Espectro UV-VIS de APL, lignina extraída mediante el uso de H₂O₂ y comercial en (a) un rango de longitud de onda 200- 400 nm y (b) de 320-400 nm 73

Lista de apéndices

Apéndice A. Caracterización FT-IR, producto a partir del experimento 8 con el DES AL-H.....	82
Apéndice B. Comparación entre los espectros IR de AAL, AHL y APL con los DES AL-A, AL-H y AL-P respectivamente.....	84
Apéndice C. Comparación entre los espectros IR de AAL, AHL y APL con (a) lignina comercial, (b) lignina obtenida mediante el tratamiento con H ₂ O ₂ y (c) lignina comercial.....	85

Glosario

AL: Ácido láctico.

AAL: Lignina aislada, extraída con el DES AL-A.

AHL: Lignina aislada, extraída con el DES AL-H.

APL: Lignina aislada, extraída con el DES AL-P.

AL-A: Solvente eutéctico formado con ácido láctico y alanina.

AL-H: Solvente eutéctico formado con ácido láctico e histidina.

AL-P: Solvente eutéctico formado con ácido láctico y prolina.

CAlanina: Cdesencerada, posteriormente deslignificada con el DES AL-A.

Cdesencerada: Chips de cáscara de cacao desencerada.

CHistidina: Cdesencerada, posteriormente deslignificada con el DES AL-H.

CPeróxido: Cdesencerada, posteriormente deslignificada por medio del método con peróxido de hidrógeno.

CProlina: Cdesencerada, posteriormente deslignificada con el DES AL-P.

DES: Solventes eutécticos profundos.

Resumen

Título: Extracción y caracterización de lignina proveniente de la cáscara de cacao utilizando solventes eutécticos profundos*

Autor: Iveth Vanessa Ayala Viloria**

Palabras clave: Lignina, monolignoles, solventes eutécticos profundos

Descripción:

La investigación con enfoque en procesos que implique el aprovechamiento de los residuos agrícolas es esencial para la bioeconomía. El uso de solventes eutécticos profundos (DES) es un método verde que logra el procesamiento de la biomasa, fraccionando efectivamente la lignina de la lignocelulosa y, consecuentemente, otorgando la capacidad de valorización de la misma. En este estudio se prioriza la extracción de lignina presente en la cáscara de cacao usando solventes eutécticos profundos (DES). Fueron sintetizados 3 tipos de DES con ácido láctico (AL) como donador de enlaces de hidrógeno y alanina (AL-A), histidina (AL-H) y prolina (AL-P) como aceptores. Se evaluó el rendimiento de extracción por medio de un diseño experimental que mostró resultados entre 8,2 y 47,8 %, siendo éstos altamente influenciados por las variables estudiadas (temperatura, tiempo de tratamiento y relación sólido-líquido), y comparados con el rendimiento de lignina obtenida por medio del uso de peróxido de hidrógeno (10,8%), en donde se resaltó el óptimo proceso de extracción de lignina con DES. Además, se obtuvo un rendimiento de deslignificación del 84,6 % (basado en la lignina inicial de la cáscara de cacao) y la cáscara deslignificada no presentó alteraciones desfavorables en la estructura cristalina de la celulosa, según los resultados DRX. Se caracterizó y comparó la lignina extraída con DES, peróxido de hidrógeno y un lignosulfonato de sodio (lignina comercial) por medio de las técnicas FTIR, TGA y UV-VIS. Los resultados mostraron en la lignina obtenida con DES la presencia de la representativa estructura aromática y sugieren un alto porcentaje de pureza en el polímero resultante.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Cristian Blanco Tirado. Codirector: Sergio Andrés Ovalle Serrano.

Abstract

Title: Extraction and characterization of lignin from cocoa pod husks using deep eutectic solvents*

Author: Iveth Vanessa Ayala Viloría**

Keywords: Lignin, monolignols, deep eutectic solvents

Description:

Research focused on the use of agricultural residues is essential for the bioeconomy. Deep eutectic solvents (DES) help in the processing of biomass, effectively fractionating the lignin from lignocellulose and facilitating its recovery. In this study, DES were used in a green method for the extraction of lignin present in the cocoa pod husk. Three different DES were synthesized with lactic acid (AL) as hydrogen bond donor and alanine (AL-A), histidine (AL-H), and proline (AL-P) as hydrogen bond acceptors. The lignin extraction efficiency was evaluated through an experimental design that showed yields ranging 8.2 and 47.8%, where temperature, treatment time, and solid-liquid ratio were the studied variables. Lignin extraction yields were higher when DES were used compared to the 10.8% lignin extraction yield obtained when alkaline hydrogen peroxide was used for the lignin extraction. In addition, even when a lignin extraction yield of 84.6% was obtained using DES, the delignified cocoa pod husk remained unaffected in terms of crystal structure of the cellulose, according to the XRD results. The lignin extracted with DES, hydrogen peroxide, and a sodium lignosulfonate (commercial lignin) were characterized through FTIR, TGA, and UV-VIS techniques. The results showed the presence of the representative aromatic structure in the lignin obtained with DES and suggest a high percentage of purity in the resulting polymer.

* Bachelor Thesis

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Cristian Blanco Tirado. Codirector: Sergio Andrés Ovalle Serrano.

Introducción

La lignina es uno de los biopolímeros más abundantes en la Tierra, de gran relevancia científica e industrial. Se encuentra en las células vegetales, más específicamente en la pared celular y se caracteriza por otorgarle rigidez y dureza a la planta (Zavaleta-Mejía & Lagunes-Fortíz, 2015). Estructuralmente, la lignina es un polímero tridimensional heterogéneo que no presenta orden o regularidad en su composición. Una de las razones por las que se considera retador el estudio de la lignina es que se pueden encontrar diferentes tipos de composición de este polímero en una misma planta, es decir, su estructura varía, dependiendo de diversos factores como la especie de la planta, el ambiente al que se somete durante el crecimiento, la edad, e incluso el método de extracción que se utilice, razón por la cual algunos autores se han referido a la lignina como un compuesto que no se encuentra oficialmente definido (Lackner, 2017).

Actualmente, la lignina es partícipe en la formación de productos de valor agregado en diferentes áreas de producción entre las cuales se encuentra el campo farmacéutico, textil y cosmético (Carvajal et al., 2016), la producción de adhesivos, surfactantes, e incluso, novedosos estudios reportan su uso como base para bioplásticos (Thielemans et al., 2002; Yang et al., 2019; Yurchenko et al., 2019); por lo que, presenta una atractiva versatilidad que impulsa el interés de la comunidad científica. La necesidad de fuentes de fácil acceso, gran abundancia y bajo costo para la obtención del polímero, propone la explotación efectiva de residuos agrícolas que además, jugarían un papel benéfico en contra de la contaminación ambiental. El cultivo de cacao, por ejemplo, es un medio que se mantiene en crecimiento y que genera altas cantidades de residuos sólidos y líquidos. La cáscara, siendo el residuo sólido principal, puede ser aprovechable como materia prima para generar subproductos de valor (Barazarte et al., 2008).

Los métodos convencionales de extracción de lignina han sido constantemente cuestionados por su influencia en la contaminación ambiental, la dificultad en sus procesos y sus altos costos. Sin embargo, diversos estudios acerca de solventes eutécticos profundos como solventes de lignina han resaltado los beneficios de este método, debido a que son solventes de bajo costo, no tóxicos, biodegradables y biorenovables, con un proceso sencillo que resulta en altos rendimientos de deslignificación y lignina extraída con provechosas propiedades químicas (Yu Chen & Mu, 2019; Loow et al., 2017; Marcus, 2019; Tan et al., 2019^a).

En el presente estudio se usó la cáscara de cacao como materia prima para la obtención de lignina usando los solventes eutécticos profundos como método de extracción. Sus rendimientos de extracción fueron comparados con uno de los métodos alternativos considerado ventajoso ante los métodos convencionales: el uso de peróxido de hidrógeno, encontrando mejores resultados de obtención por medio de los solventes eutécticos profundos, en donde, además, se logró un óptimo resultado de deslignificación de la materia vegetal.

La lignina obtenida se caracterizó y se comparó adicionalmente con lignina comercial (lignosulfonato de sodio); en donde se evidenció que, a pesar de tratarse la misma fuente y mismo método de extracción, el cambio en el tipo de solvente eutéctico profundo provocó una variabilidad en la estructura de la lignina obtenida. Sin embargo, se mantuvo su cadena aromática característica y por medio de IR se infiere la ausencia de carbohidratos propios de la matriz lignocelulósica (celulosa y hemicelulosa) y de impurezas generadas por el tratamiento (a diferencia de la lignina comercial). Además, por medio de la técnica analítica DRX fue posible verificar que, con el uso de solventes eutécticos profundos, la cáscara de cacao deslignificada no presenta alteración de la celulosa, resultando finalmente en un material con aumento en el índice de cristalinidad, apto para usos posteriores.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Extraer y caracterizar lignina presente en la cáscara de cacao usando solventes eutécticos profundos y un método convencional.

1.2 Objetivos específicos

Sintetizar los disolventes eutécticos profundos (DES) propuestos e implementarlos en el proceso de extracción de lignina.

Extraer lignina de la cáscara de cacao por medio de un método usado convencionalmente.

Realizar la caracterización físico-química de la lignina obtenida a partir de los diferentes métodos de extracción y comparar los resultados.

2. Marco teórico

2.1 Generalidades del cacao

El árbol de cacao, conocido científicamente como *Theobroma cacao L* y distinguido por su significado en hebreo como “alimento de los dioses”, es una planta perteneciente a la familia *Malváceas*, propia de América, especialmente América central y América del sur (Rojas & Sacristán Sánchez, 2013). Su cultivo se da en climas húmedos y cálidos, con un proceso de polinización se da en su mayoría gracias a insectos y, aunque el árbol de cacao florece durante todo el año, sus primeras flores empiezan a aparecer luego de tres años del sembrado. En Colombia se encuentran hasta 26 especies del fruto del cacao; sin embargo, su producción principal se centra en tres especies: *criollos*, *forasteros* y el cruce entre estos dos, que dio lugar a un híbrido denominado *trinitario*.

Theobroma cacao L es un árbol con altura entre 12-20 m y en cultivo se mantiene entre 4-8 m. El tallo es glabro de corteza oscura (marrón), sus ramas son café y finamente vellosas formadas en verticilos de 5 m. Las hojas son verdes, grandes y ligeramente ovaladas con medidas entre 17-48 cm de largo y 7-10 cm de ancho, coriáceas y glabras. Las flores son pentámeras con diámetro de 5-20 mm; presentan pedúnculo corto y grueso que mide 1-4 cm de largo; sus sépalos son verdosos, blancos o rosa pálido en forma de copa; los pétalos son amarillentos de 6 a 9 mm de largo con nervios violeta adentro (Medina et al., 2009; Nicolas et al., 2011). El fruto del cacao se caracteriza por ser una baya elipsoidal u ovalada que mide entre 10 y 30 cm de longitud, con una corteza de color rojizo-anaranjado (comúnmente), agrietada, áspera y dura, más conocida como cáscara, que puede contener de 20 a 40 granos o almendras (Aculey et al., 2010) (Figura 1). Dichos granos de cacao se encuentran unidos entre sí y a la cáscara, por un material vegetal llamado

placenta. Además, están recubiertos por una cascarilla color marrón delgada y ésta, a su vez, se presenta rodeada de una capa de materia orgánica blanca denominada mucílago o pulpa. El mucílago, al igual que el líquido que lo acompaña (lixiviado) es característico por su atractivo sabor agridulce y está compuesto por carbohidratos (glucosa, fructosa, sacarosa), proteínas, grasas, entre otros (Suarez Gamboa, 2019). El fruto del cacao también se conoce por sus propiedades nutritivas ya que, además de los compuestos mencionados anteriormente, contiene fibra, vitaminas y minerales (*USDA National Nutrient Database*, n.d.).

Figura 1

Fruto del cacao



Nota. Tomado de Grupo de Investigación en Fisicoquímica Teórica y Experimental (GIFTEX).

El cultivo de cacao es de gran interés debido a que su fruto es materia prima para importantes productos en las industrias alimentos y cosméticos (Enriquez, 1985). El tratamiento del cacao para la producción de chocolate y sus derivados involucra diferentes procesos que empiezan por su cultivo, continúan en su sostenimiento y posteriormente culminan en la transformación de la materia prima. La transformación a la que se somete el cacao implica el desgranado de las

mazorcas, la separación de sus ingredientes, el proceso de fermentación, secado, recolección, etc (Ortiz & Álvarez, 2015). Durante el tratamiento de este fruto se generan gran cantidad de desechos sólidos y líquidos que afectan al medio ambiente y, por tanto, a la población. En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de cada material que compone al fruto del cacao. Puede notarse que el porcentaje de utilidad del fruto es del 10%, mientras los demás componentes son considerados desechos agroindustriales (Chafla et al., 2016; Graziani de Fariñas et al., 2002; Quimbita & Rodríguez, 2008). A pesar de que muchos desechos sólidos se usaban como abono para las tierras de cultivo y alimento para animales (Costa, 2016; Ramírez et al., 2014), la rapidez en el crecimiento de la producción de los derivados de cacao ha sido un inconveniente para el buen uso de los residuos generados por la industria cacaotera. De la Tabla 1 puede observarse que el compuesto con mayor porcentaje es la cáscara, un desecho lignocelulósico que, por su tamaño y forma cóncava con la capacidad de almacenar agua en climas lluviosos, favorece la propagación de insectos y microorganismos afectando los cultivos y la salud de los cultivadores (Ortiz & Álvarez, 2015), razón por la cual se ha considerado la cáscara de cacao un problema de afectación económica, ambiental y social en la industria cacaotera.

Tabla 1

Componentes del fruto del cacao

Compuesto	Porcentaje (%)
Cáscara	77,5
Granos	10,0
Placenta	2,14
Exudado	3,60
Mucílago + Cascarilla	6,80

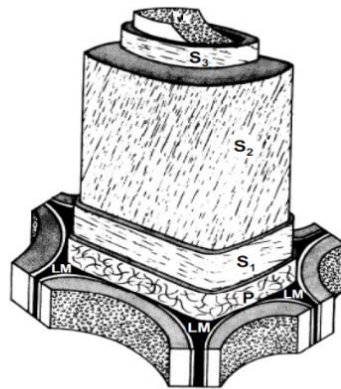
2.2 Composición de la materia vegetal

Las particulares propiedades físicas y químicas de los materiales lignocelulósicos están dadas por la coordinación y estructuración de cada uno de sus componentes ejecutando sus funciones respectivas. La materia vegetal está constituida por células (fibras) con paredes celulares caracterizadas por ser estructuras complejas y semirrígidas, que contienen celulosa, hemicelulosa y lignina como componentes primarios (denominados así por su abundancia y relevancia en las propiedades de la pared celular) y grasas, resinas, alcaloides, proteínas, ceras, azúcares, sales minerales, taninos, etc, como compuestos secundarios (considerados sustancias de impregnación y “extraños” a la pared celular, debido a que se incorporan después de la formación de la misma) (Zanni, 2008).

Esquemáticamente, la pared celular de las fibras consta de tres partes, que en orden de exterior a interior son: 1) lámina media o pared intracelular (LM), constituida principalmente por lignina (siendo la zona con mayor concentración de dicho polímero) y hemicelulosa, con un espesor entre 0,2 y 1 μm ; 2) pared primaria (P), es la zona de menor espesor (0,1-0,2 μm) constituida por celulosa y una gran porción de hemicelulosa y lignina; 3), pared secundaria (S), formada por altas concentraciones de celulosa y poca lignina, se presenta en tres capas diferentes debido a las propiedades físicas y químicas específicas de cada una (diferentes entre sí) que se generan por la variedad en la orientación de sus microfibrillas en cada capa: la capa externa (S_1) con 0,2-0,3 μm de espesor, la capa media central (S_2) de 1-5 μm y la capa interna (S_3) de 0,1 μm (Figura 2) (Sjöström, 1993).

Figura 2

Estructura de la composición de la materia vegetal



Nota. Adaptado de *Estudio de lignina y lípidos en madera de eucalipto: Caracterización química en distintas especies y su evolución durante la fabricación y blanqueo químico y enzimático de la pasta de papel*, por Jorge Rencoret, 2008 (Pazo, 2008).

En cuanto a la cáscara de cacao, se muestra en la Tabla 2 el porcentaje de sus principales componentes que lo hacen un material vegetal atractivo para su aprovechamiento, gracias al porcentaje del fruto que representa y a sus altos contenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina.

Tabla 2

Composición química de la cáscara de cacao

Compuesto	Porcentaje (%)
Celulosa	30,02
Hemicelulosa	23,93
Lignina	28,73
Otros*	17,14

Nota: Datos otorgados por el proyecto Nextcoa.

*Compuestos secundarios de la cáscara de cacao.

2.3 Lignina

El término lignina proviene de la palabra madera en latín (*lignum*), el cual fue usado por primera vez por Franz Ferdinand Schulze en 1857, luego de que Alsen Penn planteara la existencia de un material con alto contenido de carbono que difería a la celulosa, durante su trabajo en el tratamiento de la madera en 1830 (Huang & Shiyu Fu Lin Gan, 2019). Este compuesto es el segundo polímero natural más abundante en la tierra (después de la celulosa), hallándose en maderas de coníferas entre un 25 y 33% y en madera de frondosas entre un 18 y 34% (Pazo, 2008).

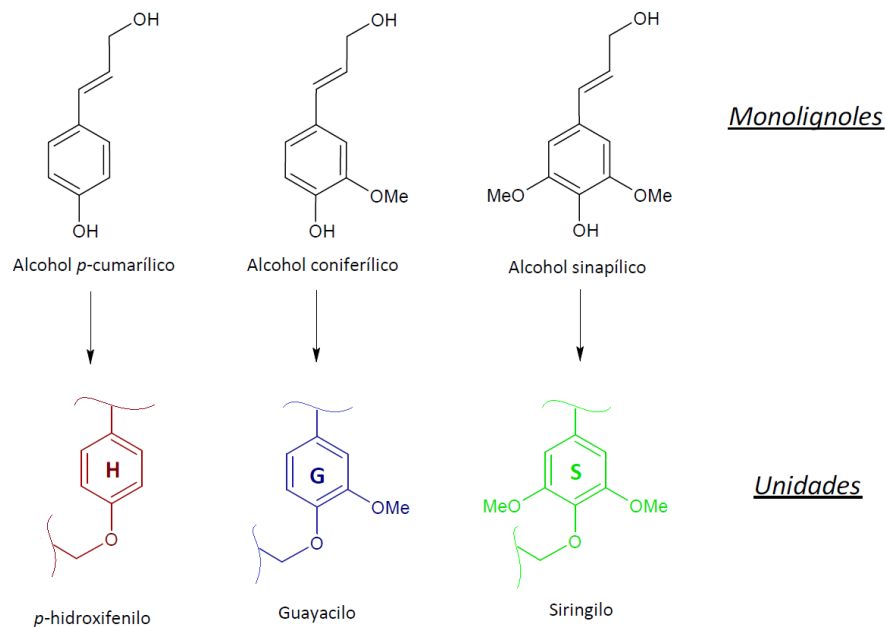
La lignina es un polímero orgánico encontrado mayormente en la lámina media de la pared celular vegetal, más específicamente en células esclereidas, traqueidas, elementos de los vasos, y fibras del xilema y floema. Es un compuesto fundamental de la planta, ya que participa en diversas funciones de vital importancia como el transporte interno de agua, nutrientes y metabolitos, la defensa contra patógenos y resistencia a degradación por enzimas y el proporcionar rigidez a los tejidos vegetales, generando un material notablemente resistente a impactos y flexiones (Zavaleta-Mejía & Lagunes-Fortíz, 2015).

Debido a su complejidad, la estructura de la lignina aún es uno de los temas de discusión en el campo de los polímeros naturales. Estudios científicos acerca de su estereoquímica han determinado centros asimétricos en las moléculas de lignina y sus productos de degradación; sin embargo, no hay actividad óptica, es decir, no está conformada con un único tipo de enlace clave como otros biopolímeros (por ejemplo, la celulosa), razón por la cual no puede ser fácilmente resuelta por métodos de degradación general. Además, la variación de composición de lignina en cada tipo de planta, y los demás aspectos influyentes en la síntesis de sus monómeros, afectan su caracterización estructural, análisis de composición y aislamiento (R. Sun et al., 2010).

Hasta la actualidad, se conoce que la lignina es una red tridimensional heterogénea de compuestos aromáticos, en donde se pueden encontrar tres tipos de monolignoles: alcohol *p*-coumarílico (4-hidroxicinamílico), alcohol coniferílico (3-metoxi 4-hidroxicinamílico) y alcohol sinapílico (3,5-dimetoxi 4-hidroxicinamílico). Luego de su incorporación al polímero de lignina, se distinguen como unidades *p*-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S), respectivamente. Estos monolignoles se diferencian por su grado de metoxilación: en el alcohol sinapílico, se encuentran dos grupos metoxilos en las posiciones C₃ y C₅ de su anillo aromático, el alcohol coniferílico presenta un solo grupo metoxilo en C₃, y el alcohol *p*-coumarílico carece de dicho sustituyente (Huang et al., 2019) (Figura 3).

Figura 3

Estructuras de los compuestos monoméricos de la lignina, presentado en forma de monolignoles y como unidades del polímero



Nota. Adaptado de *Caracterización química y estructural de lignina y lípidos de materiales lignocelulósicos de interés industrial*, por Prinsen, 2013 (Prinsen, 2013).

La proporción de cada monolignol presente en la lignina varía dependiendo de la especie vegetal, e incluso en una misma planta, la distribución de los monolignoles difiere conforme a la edad, el tipo de células o la parte de la planta que se analice. Además, también son influyentes los factores ambientales, las condiciones de estrés y el desarrollo mismo de la planta (Lackner, 2017; Lauwaert et al., 2019). En general, la lignina en maderas coníferas está compuesta principalmente por unidades G, las frondosas por unidades S-G y las plantas herbáceas por unidades H-G-S.

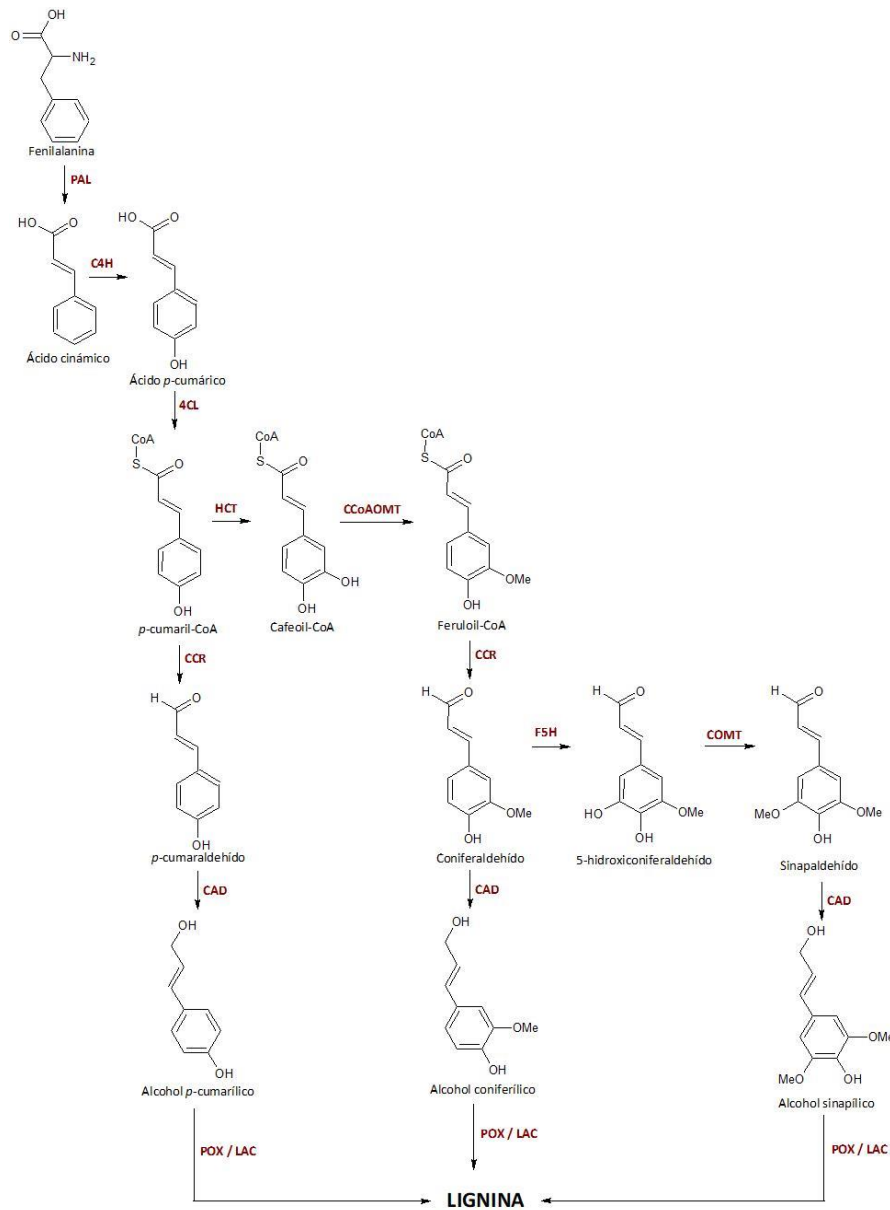
El proceso biosintético de los monómeros de lignina (Figura 4) implica la participación de dos rutas metabólicas, iniciando con la ruta de shikimato para la producción de fenilalanina, y continuando con la ruta fenilpropanoide desde la fenilalanina hasta la formación de los alcoholes cinamílicos (Boerjan et al., 2003). Este suceso involucra reacciones de desaminación, hidroxilaciones y de O-metilación.

2.3.1 Grupos funcionales

Los grupos funcionales juegan un papel importante en la lignina, ya que son los determinantes de sus propiedades ópticas, de las características de dispersión y de su reactividad química. En la lignina se pueden diferenciar grupos como: hidroxilo (tanto de manera alifática como fenólica), el cual es el grupo funcional de mayor abundancia en la lignina y presenta gran relevancia en la industria debido a que es el más reactivo del polímero (Tan et al., 2019^a), despertando interés ante la preparación de materiales funcionales a partir de la modificación de la lignina; metoxilos y carbonilos (como aldehídos y cetonas) que se pueden presentar de manera conjugada o no conjugada, éstos también establecen la reactividad química e influyen en las características ópticas, por medio de compuestos como el benceno conjugado con carbonilo (Huang et al., 2019).

Figura 4

Esquema de la biosíntesis de lignina por medio de la ruta fenilpropanoide



Nota. PAL: fenilalanina amonio liasa; C4H: cinamato-4-hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato: CoA ligasa; HCT: hidroxicinamoil transferasa; CCoAOMT: cafeoil CoA-O-metiltransferasa; CCR: cinamoil-CoA reductasa; F5H: ferulato 5-hidroxilasa; COMT: ácido caféico O-metiltransferasa;

CAD: cinamil alcohol deshidrogenasa; POX: peroxidases; LAC: lacasas. Adaptado de *Lignin biosynthesis*, por Boerjan, et al, 2003 (Boerjan et al., 2003).

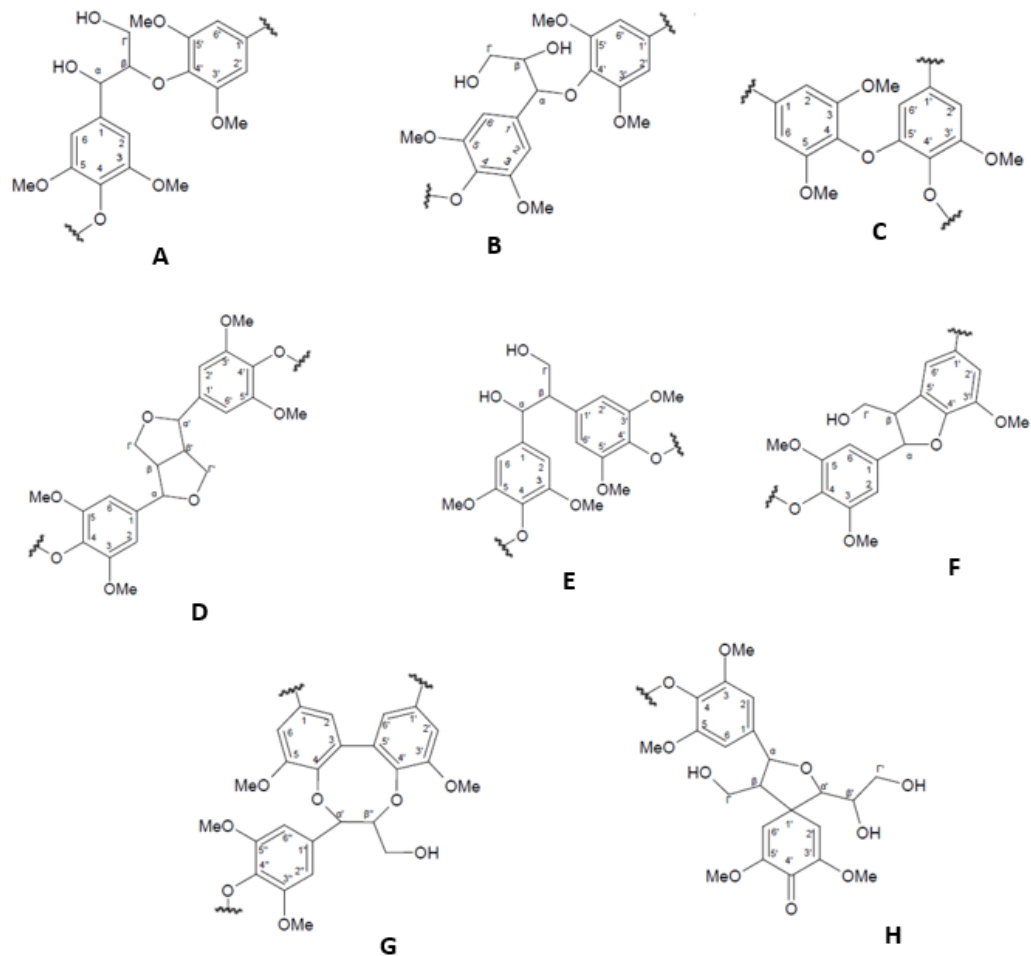
2.3.2 Tipos de uniones

En general, el tipo de uniones entre los monolignoles para la formación del polímero se clasifican en dos: tipo éter y tipo carbono-carbono, también llamados enlaces condensados (Figura 5). Del tipo éter se encuentran uniones alquil-aril éter como β -O-4' (la unión más frecuente) (A) y α -O-4' (B) y la unión aril-aril éter, como 4-O-5' (C).

En cuanto a las uniones tipo carbono-carbono, se hallan β - β ' (resinol) (D); β -1' © y β -5' (fenilcumarano) (F) y enlace 5-5' o bifenilo, el cual se encuentra en forma de trímero, generando una estructura tipo dibenzodioxocina (G) (Karhunen et al., 1995). Estudios recientes han señalado que las uniones β -1' pueden observarse también en forma de espirodienonas (H) (L. Zhang et al., 2006).

Figura 5

Uniones tipo éter y carbono-carbono entre los monómeros de la lignina

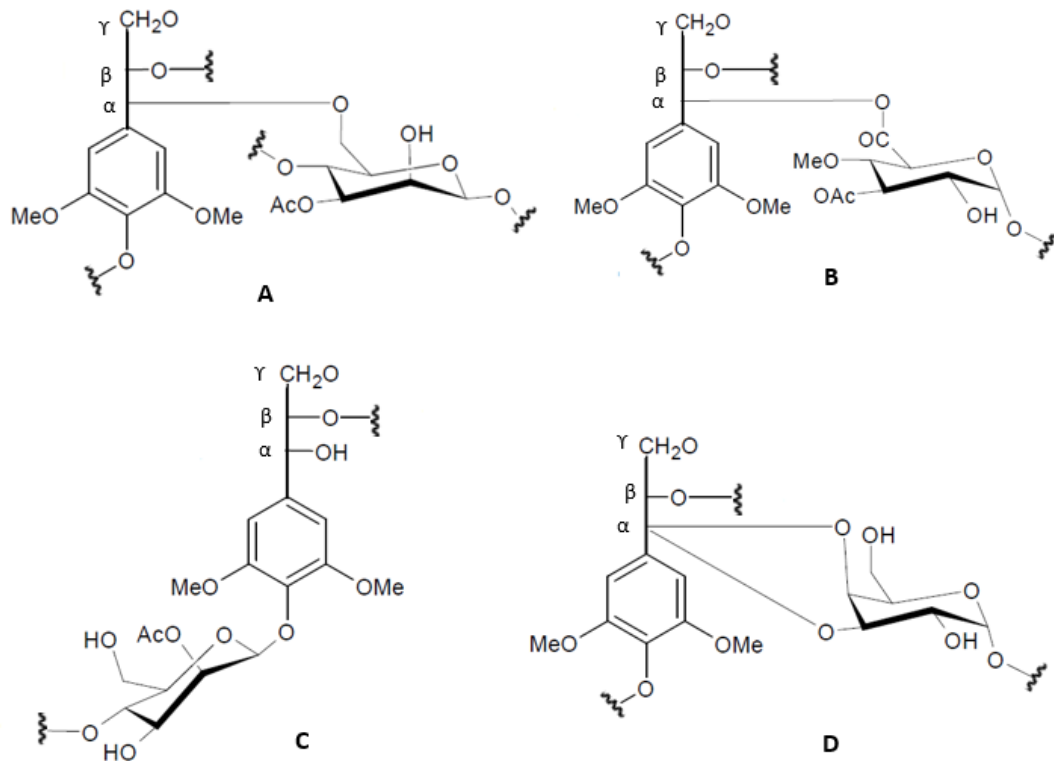


Nota. Adaptado de *Estudio de lignina y lípidos en madera de eucalipto: Caracterización química en distintas especies y su evolución durante la fabricación y blanqueo químico y enzimático de la pasta de papel*, por Jorge Rencoret, 2008 (Pazo, 2008).

Una de las funciones más llamativas de la lignina es la rigidez que le otorga a la pared celular, la cual se debe a uniones covalentes entre los monómeros de la lignina y la celulosa y hemicelulosas, formando los complejos lignina-carbohidrato (Watanabe, 2003) (Figura 6). Estos enlaces son del tipo bencil-éter (A), bencil-éter (B), glicosídico (C) y acetal (D).

Figura 6

Tipos de uniones entre la lignina y la hemicelulosa.

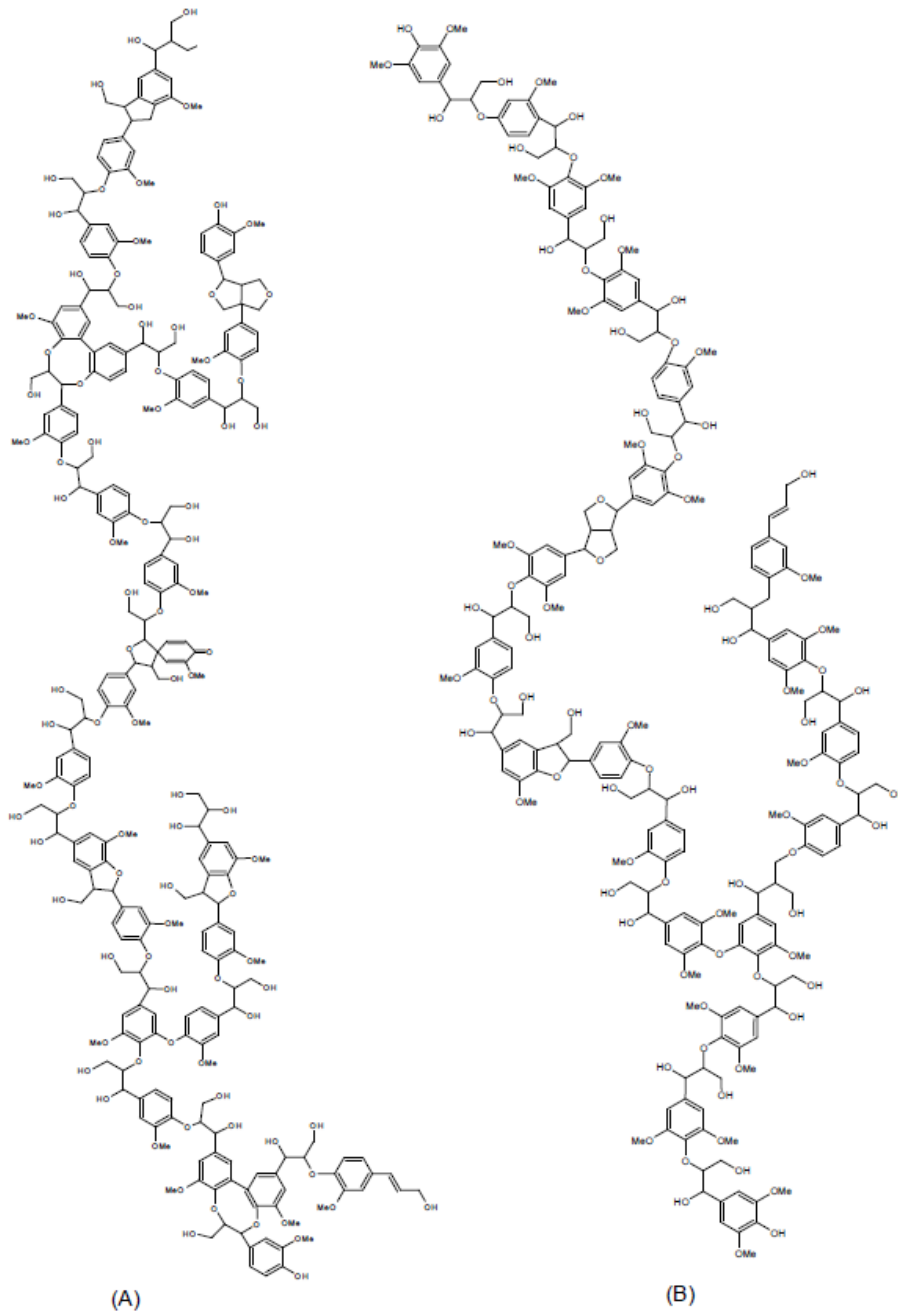


Nota. Adaptado de *Estudio de lignina y lípidos en madera de eucalipto: Caracterización química en distintas especies y su evolución durante la fabricación y blanqueo químico y enzimático de la pasta de papel*, por Jorge Rencoret, 2008 (Pazo, 2008).

Como se ha mencionado anteriormente, en la actualidad la lignina aún no es un polímero totalmente definido; no obstante, se han propuesto modelos estructurales a través de los años, que avanzan conforme a la disposición de técnicas analíticas de mayor adecuación y a su vez mejoran y complementan dichos modelos. La estructura propuesta por Brunow y Boerjan se muestra en la Figura 7 (Huang et al., 2019).

Figura 7

Modelo del polímero de lignina propuesto por Brunow y Boerjan. (A) Estructura con unidades guayacilo. (B) Estructura con unidades guayacilo y siringilo.



Nota. Adaptado de *Lignin Chemistry and Applications* (p.38), por Huang, et al, 2019 (Huang et al., 2019).

2.4 Métodos convencionales de extracción de lignina

2.4.1 Método sulfito

Método usado por primera vez en 1874 por Ekman, siendo éste el proceso de fabricación de pulpa para la producción de papel más antiguo con el que se puede obtener lignina como un subproducto. A pesar de que aún es la fuente de lignina comercialmente más abundante, su auge disminuyó drásticamente con el surgimiento del proceso Kraft, debido a su versatilidad y al tipo de lignina obtenida finalmente (Tribot et al., 2019).

La extracción de lignina por medio del método sulfito se basa en el uso de una solución acuosa de azufre (SO_2) y una base de calcio, sodio, magnesio o amonio (Carvajal et al., 2016). La lignina tipo sulfito presenta grandes cantidades de azufre en su composición cuyo contenido oscila entre el 4 y 8%. Este elemento se encuentra mayormente en forma de sulfonatos y en una menor proporción en forma de sulfitos y sulfatos. (Chávez Sifontes & Domine, 2013).

2.4.2 Método Kraft

El método Kraft es el más empleado en la separación de lignina presente en materiales vegetales, principalmente para la producción de pulpa de celulosa y papel (Carvajal et al., 2016), de donde se obtiene como un subproducto la “lignina Kraft”, de la cual sólo es usado el 2% para productos de valor agregado, ya que su uso principal se basa en fines energéticos (Tribot et al., 2019).

El proceso consta de una disolución en hidróxido de sodio (NaOH) y sulfuro de sodio (Na_2S) a altas temperaturas (150-180 °C) en donde se llevan a cabo varias reacciones como la escisión de enlaces lignina-carbohidrato, la despolimerización de la lignina (principalmente actuando en los

enlaces aril éter), reacción con el ion hidrosulfuro y su recondensación (Belgacem & Gandini, 2008). La lignina Kraft contiene un 2-3 % de azufre (menor cantidad comparada con la lignina obtenida a partir del proceso sulfito), estimando que se encuentra mayormente en la forma de sulfito y sulfuro y en menor proporción en forma de grupos disulfuro y ditiano (Bu et al., 2012; Obst & Kirk, 1988). La recuperación de la lignina luego de ser diluida se realiza por medio de la disminución del pH con ácidos inorgánicos como sulfúrico o clorhídrico, que permite la precipitación de la misma.

Entre las desventajas del proceso Kraft, se encuentra la necesidad de productos químicos alcalinos, los cuales promueven la corrosión de metales y olores desagradables. Además, en comparación con los estudios de extracción con solventes “verdes”, este proceso genera residuos tóxicos y poco amigables con el medio ambiente (van Osch et al., 2017).

2.4.3 Método de extracción con peróxido de hidrógeno

El método de extracción de lignina con peróxido de hidrógeno alcalino se usa comúnmente para el blanqueamiento de la biomasa lignocelulósica, el cual se da gracias a la interacción entre el medio disolvente y estructuras cromóforas de la lignina (R. C. Sun et al., 2000). Al someter el peróxido de hidrógeno a condiciones alcalinas se forma el ion hidroperóxido (HOO^-), un nucleófilo fuerte que ataca preferentemente a los grupos etilénicos y carbonílicos de la lignina, generando moléculas sin la capacidad de reflejar color. Por otro lado, la disolución de la lignina se logra por medio de los radicales formados a partir de la descomposición del peróxido de hidrógeno en condiciones alcalinas (Ovalle-Serrano et al., 2018; R. C. Sun et al., 2000).

Los parámetros mayormente empleados y de mejor rendimiento durante el proceso de extracción, son soluciones con peróxido en concentraciones entre 2 y 10% p/p (Ma et al., 2020);

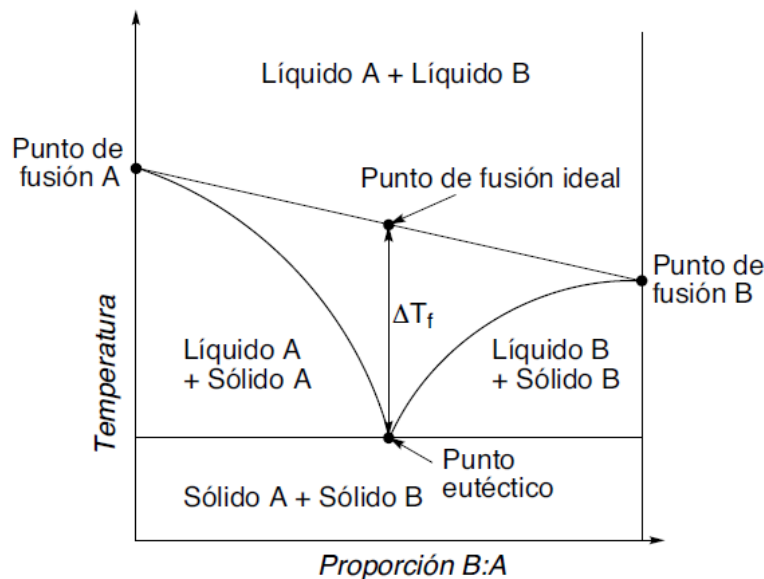
pH en 11,5 (Gould, 1985); Temperaturas entre 60 y 70 °C (R. C. Sun et al., 2000) y tiempos de reacción entre 2 y 3 horas. Este tratamiento provoca la separación de lignina y hemicelulosa de la materia vegetal en estudio, por lo que es necesario un posterior proceso de separación entre dichos compuestos.

2.5 Solventes Eutécticos Profundos

Los solventes eutécticos de bajo punto de fusión (en inglés *Deep Eutectic Solvents* (DES)) fueron un tema presentado por primera vez en 2003 por Abbott y sus colaboradores en el estudio de novedosas propiedades a partir de la mezcla de cloruro de colina y urea (Perna et al., 2020; van Osch et al., 2017). Los DES son mezclas con proporciones determinadas entre dos o más compuestos de altos puntos de fusión (usualmente sólidos o una combinación entre sólidos y líquidos) que, al unirse, forman una fase líquida con fuertes interacciones entre sí a una temperatura específica (denominada punto eutéctico), la cual es mucho más baja que la temperatura de fusión de los compuestos empleados individualmente, permitiendo que la mezcla formada se mantenga en fase líquida en condiciones ambientales (Figura 8) (Marcus, 2019; Perna et al., 2020).

Figura 8

Diagrama de fase de una mezcla de compuestos formando un DES

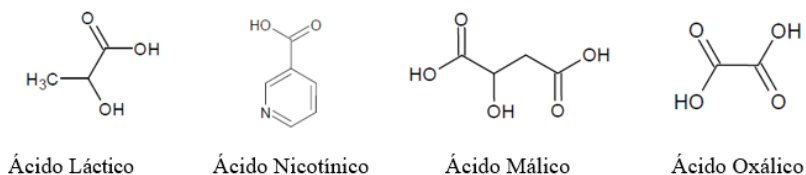
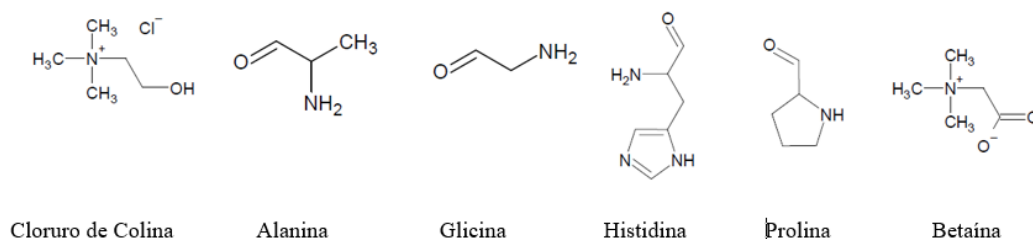


Nota. Tomado de *Mezclas eutécticas como alternativa sostenible a los disolventes convencionales en Química Orgánica*, por Alonso, D. et al. 2018 (Alonso et al., 2018).

Los líquidos eutécticos están conformados por un compuesto con carácter dador de enlaces de hidrógeno (DH) y otro que actúe como aceptor de enlaces de hidrógeno (AH), que generalmente es una sal. Cuando se mezclan, se da lugar a la formación de enlaces de hidrógeno entre los componentes, provocando la deslocalización del anión de la sal y consecuentemente disminuyendo la fuerza del enlace iónico entre el catión y el anión de la sal. Así, la energía de la red cristalina se distorsiona e induce la disminución del punto de fusión de la mezcla o líquido formado (Alonso et al., 2018; Perna et al., 2020). En la Figura 9 se muestran diferentes compuestos entre dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno que pueden formar DES a partir de sus diversas mezclas.

Figura 9

Estructuras de compuestos formadores de DES

Dadores de Enlaces de Hidrógeno (DH)**Aceptores de Enlaces de Hidrógeno (AH)**

El gran interés en la última década por los solventes eutécticos se debe a la amplia variedad de sus propiedades y su relación con el medio ambiente, que permite útiles aplicaciones en campos como biotecnología, nanoquímica, procesos de extracción, separación y catálisis (Francisco et al., 2012; Marcus, 2019). Las diferentes mezclas entre los DH y AH generan solventes con polaridades presentes en un extenso rango de valores (entre 4 y 80) (Buchwald, 2012), de baja volatilidad, altas conductividades y no inflamables. Además, son de relevancia en la química verde por sus características no tóxicas, biodegradables, biorenovables, de bajo costo y fácil proceso de síntesis (Cai & Qiu, 2019; Gonzalez et al., 2020; Loow et al., 2017).

En término de desventajas los solventes eutécticos, en su mayoría, presentan altos valores de viscosidad, razón por la cual, su manipulación es compleja y dificulta algunos procesos en distintas áreas de aplicación. Es aquí donde se da a lugar a un tercer compuesto en la formación de los DES como solución a esta característica, el cual suele ser otro agente donador de enlaces de hidrógeno como el agua, que permita la disminución de viscosidad del solvente (Marcus, 2019).

2.5.1 Selectividad de los solventes eutécticos profundos

La selectividad de los solventes eutécticos para la disolución de la lignina y hemicelulosa en los materiales vegetales ha sido mencionada y estudiada en diversas investigaciones (Alvarez-Vasco et al., 2016; Malaeke et al., 2018; Tan et al., 2018). La primera actividad significativa del tratamiento sobre la biomasa lignocelulósica se basa en la separación del complejo lignina-carbohidratos, logrando el aislamiento de la celulosa y por tanto, infiriendo un alto grado de pureza en la lignina extraída (Alvarez-Vasco et al., 2016; Z. Chen et al., 2020). Se ha reportado que, como siguiente paso, el DES promueve la ruptura de enlaces de hidrógeno intermoleculares rígidos de la lignina influyendo en el proceso de disolución, el cual es completado posteriormente por medio de la formación de enlaces de hidrógeno entre el soluto y el solvente, recalcando que la propiedad iónico-molecular del DES beneficia la movilidad y difusividad de la lignina durante su tratamiento (Lyu et al., 2019; Malaeke et al., 2018; Tan et al., 2018). Adicionalmente, numerosos investigadores han reportado una escisión de los enlaces β -O-4 de la lignina durante el tratamiento con DES asegurando que, de modo contrario, los enlaces C-C no son afectados (Jablonsky et al., 2019; T. Li et al., 2017; Lyu et al., 2018; Smink et al., 2019). A pesar de que se conoce que los compuestos del DES (donador de enlaces de hidrógeno y aceptor de enlaces de hidrógeno) realizan un papel importante en la disolución del biopolímero (que no logran por separado), aún se requieren más estudios las funciones específicas de cada compuesto en el tratamiento.

2.6 Comparación entre métodos de extracción de lignina

La Tabla 3 resume las características de los procedimientos y del producto obtenido a partir de los diferentes métodos de extracción nombrados anteriormente.

Tabla 3.

Comparación entre métodos de extracción de lignina

Método de extracción	Procedimiento	Resultado
Sulfito	Requiere altas temperaturas, uso de solventes tóxicos, altos costos y difícil proceso de purificación.	Lignina impura, con concentraciones de azufre entre 4 y 8 % en su estructura. Rendimientos de extracción bajos.
Kraft	Uso de solventes tóxicos, altas temperaturas y bajos niveles de pH.	Lignina con azufre en 2-3%. Genera residuos tóxicos.
Uso de peróxido de hidrógeno	Condiciones de tratamiento suaves (bajas temperaturas en tiempos de calentamiento cortos), pero altos valores de pH. Procedimiento de alto costo a gran escala.	Altos rendimientos de extracción y bajo porcentaje de pureza de la lignina. Genera desechos tóxicos.
Uso de DES	Uso de solventes amigables con el medio ambiente, no tóxicos. Su proceso es sencillo y de bajo costo.	Lignina con alto porcentaje de pureza, morfología regular y micronizada, altos rendimientos de extracción. Los solventes son reutilizables.

3. Antecedentes

A lo largo de la historia destacados científicos se han enfocado en el estudio de la lignina, especialmente en su estructura y sus métodos de extracción. De estos estudios ha surgido información acerca de las unidades básicas que conforman la lignina y sus patrones de unión, generando así la posibilidad de deducir su modelo estructural. Sin embargo, dada la complejidad de la estructura de la lignina, este polímero aún es tema de investigación. Luego de la denominación de “*lignina*” al material con alto contenido de carbono presente en la materia vegetal, realizado por Franz Ferdinand Schulze en 1857, Benjamin Chew Tilghman desarrolló el método sulfito en 1866, generando gran interés entre los investigadores ante las reacciones químicas en el proceso de pulpeo, siendo la lignina el objeto de estudio principal (Huang & Shiyu Fu Lin Gan, 2019). A partir de las definiciones del método sulfito, Carl Ferdinand Dahl propuso el método Kraft, del cual publicó su patente en 1884 (Dahl, 1884). A pesar de que estos métodos eran ampliamente utilizados y marcaban la industria de pulpa y papel, la lignina resultante presentaba modificaciones recalcitrantes en la estructura que la diferenciaban de su forma nativa, en especial por los altos contenidos de contaminantes de azufre que obstaculizarían diversos procesamientos posteriores del polímero (Laurichesse & Avérous, 2014).

Como resultado de fructuosos estudios basados especialmente en el blanqueo de la biomasa lignocelulósica, Stobo y Russell sugirieron el uso de peróxido de hidrógeno como un potente compuesto para la oxidación selectiva de la lignina en 1947 (Reeves, 1964). A partir de esta época, se realizaron diversas investigaciones con el objetivo de proporcionar el mejor método de extracción de lignina, de tal forma que optimizara el proceso y resultados sin afectar significativamente su estructura. Así, se implementaron métodos como el organosolv (uso de solventes orgánicos) y líquidos iónicos, a través de los cuales se logran considerables porcentajes

de extracción de lignina sin afectar drásticamente su pureza. No obstante, en el caso organosolv las cantidades de solventes orgánicos requeridos para el proceso originan altos costos, y emisiones inflamables y peligrosas (van Osch et al., 2017). Asimismo, el uso de líquidos iónicos conlleva una metodología complicada con grandes cantidades de solventes, que resultan ser no tan “verdes” y costosos (Yu Chen & Mu, 2019).

En 2003 abbott *et. Al.* Introdujeron en el área de la química verde los solventes eutécticos profundos (DES) que, por sus excelentes propiedades resultan ser prometedores para diversos campos de aplicación. Sin embargo, la habilidad del DES en solubilidad de biomasa lignocelulósica fue demostrada por primera vez en 2012 por Francisco *et. Al.* (Tan et al., 2020a). En su patente titulada “*Pretreatment of lignocellulosic biomass and recovery of substituents using natural deep eutectic solvents/compound mixtures with low transition temperatures*” publicada en 2013 (Kroon et al., 2013), se registraron una serie de experimentos de extracción de lignina a la paja de trigo a partir de DES formados por diferentes compuestos catalogados como dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno (tales como ácido láctico y alanina, respectivamente), en donde se obtuvieron diversos porcentajes de lignina extraída según el DES usado y, de los cuales, el mayor fue de 14%, logrado con la mezcla eutéctica entre ácido málico y prolina. Desde este punto, se han realizado estudios acerca de la extracción de lignina por medio de solventes eutécticos profundos en diferentes materias primas como madera de sauce y álamo (Alvarez-Vasco et al., 2016; T. Li et al., 2017), pino taeda (Lynam et al., 2017), eucalipto, entre otros (Lyu et al., 2019), con porcentajes de deslignificación de hasta >90% (T. Li et al., 2017), y con una recuperación de lignina hasta más del 40% (Alvarez-Vasco et al., 2016). Además, se han reportado características benéficas de la lignina obtenida a partir de los DES para posteriores aplicaciones en la industria (ej. Biocombustibles), tales como altos porcentajes de pureza (Alvarez-Vasco et al., 2016; T. Li et

al., 2017), alto contenido de grupos fenólicos (Z. Chen et al., 2020), morfología regular y micronizada (Malaeké et al., 2018) y bajos porcentajes de azufre en su composición (que pertenece a la lignina nativa como trazas de los nutrientes esenciales de la planta durante su formación, es decir, no hace parte de contaminantes agregados por medio del método de extracción) (Tan et al., 2020b).

A pesar de que el campo de uso de los DES para el tratamiento de biomasa lignocelulósica ha sido de gran interés y de abundante aplicación en la última década, aún no se ha reportado su uso para la extracción de lignina presente en la cáscara de cacao, que permita el aprovechamiento de este desecho agroindustrial.

4. Metodología

4.1 Materiales y reactivos

La lignina comercial (lignosulfonato de sodio) fue adquirida de Colresin S.A., derivada del licor de sulfito de madera de abeto fermentado. El ácido láctico (91,4%), alanina (99,2%), histidina (99,6) y prolina (99,6%) se obtuvieron de PanReac (Madrid, España). El peróxido de hidrógeno (33%), hidróxido de sodio, ácido clorhídrico (37%), y etanol (99%) fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania).

4.2 Pretratamiento y desencerado de la cáscara de cacao

Se usó cáscara de cacao del tipo CNN-51 cultivado en el municipio Carmen de Chucurí, Santander, Colombia, la cual fue triturada con un picador forrajero TRF 300 en tamaños irregulares o “chips” y, posteriormente, secada al sol.

El desencerado de la materia prima se ejecutó de acuerdo a lo establecido en el procedimiento analítico de laboratorio NREL (A. Sluiter, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter & Templeton, 2008), usando etanol 99% como solvente y por medio de un aparato Soxhlet. La temperatura se fijó de tal manera que se realizaran 2 sifones por hora y se mantuvo el reflujo por 60 h con agitación constante. Al finalizar, la cáscara se secó a 40 °C por 12 h, se reservó en un desecador y se etiquetó como Cdesencerada.

4.3 Extracción de lignina con el uso de DES

4.3.1 Síntesis del DES

Para cada experimento realizado se sintetizaron 50 mL de DES, agregando en un matraz los compuestos formadores del DES (donador y aceptor de puentes de hidrógeno), teniendo en cuenta las condiciones mostradas en la Tabla 4. Seguidamente, con agitación constante se sometió a

calentamiento por medio de un baño de arena manteniendo la temperatura a 60 °C hasta que se logró la homogeneidad del solvente (Kroon et al., 2013). El procedimiento de síntesis se consideró apropiado al corroborar la preservación en la homogeneidad del DES, después de 24 h de reposo a temperatura ambiente.

Tabla 4

Condiciones para la formación de DES

Donador	Aceptor	Abreviatura	Relación molar	Temperatura (°C)
Ácido láctico	Alanina	AL-A	9:1	60
Ácido láctico	Histidina	AL-H	9:1	60
Ácido láctico	Prolina	AL-P	2:1	60

4.3.2 Extracción de lignina

Con el fin de determinar las condiciones óptimas para la extracción de lignina de la cáscara de cacao usando los DES, se realizó un diseño experimental (diseño factorial 2³, con un punto central por triplicado) considerando como variables la temperatura de calentamiento, el tiempo y la relación sólido – líquido entre la fuente de extracción y el solvente. Este diseño se implementó para el proceso de extracción con cada solvente eutéctico sintetizado.

Con los DES recién preparados, se ajustó la temperatura y se añadió una cantidad determinada de cáscara de cacao desencerada, manteniendo la agitación constante (escala de

velocidad 2 en un agitador magnético IKA C-MAG HS 7) por un tiempo determinado. Dicho proceso se llevó a cabo teniendo en cuenta las condiciones establecidas en la Tabla 5.

Tabla 5

Condiciones para la extracción de lignina con DES.

Exp	Relación sólido- líquido (g/10 mL)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)
1	0,3	4	80
2	0,3	8	80
3	0,1	8	80
4	0,2	6	100
5	0,3	4	120
6	0,1	4	120
7	0,1	4	80
8	0,3	8	120
9	0,2	6	100
10	0,1	8	120
11	0,2	6	100

Pasado el tiempo de extracción, se filtró la solución en caliente con un filtro de tela. La cáscara de cacao deslignificada se lavó con una mezcla de agua tipo I y etanol 99% en relación 50:50 y se secó a 40 °C por 24 h. Finalmente, se almacenó en un desecador para posteriores análisis.

Al filtrado resultante (DES con lignina extraída, diluida) se le agregó una solución formada por proporciones iguales en volumen de agua tipo I fría y etanol (99%) en relación 1:1 (filtrado:solución) y se almacenó a 4 °C por 48 h para conseguir la precipitación de la lignina. Posteriormente, se separó la lignina de la solución por medio de 4 etapas de centrifugación (centrífuga Hettich, Universal 320 R) a 7000 rpm por 15 minutos y 4 °C. La primera centrifugación se llevó a cabo con 40 mL de solución por tubo de centrifuga. Al finalizar el proceso de separación, se apartó la mitad del solvente presente en el tubo de centrifuga evitando sustraer el precipitado consigo, dejando así 20 mL de solución dispuestos para la segunda etapa, en donde se logró una mayor separación sólido-líquido. La tercera y cuarta centrifugaciones se hicieron con el objetivo de lavar el precipitado: luego de separar el solvente de la lignina precipitada, se agregó una mezcla de agua tipo I y etanol al 99% en relación 1:1 en el tubo de centrifuga, se redispersó la lignina y, de esta manera, se llevaron a cabo las tercera y cuarta etapas de centrifugación. La lignina obtenida se transfirió a un recipiente de vidrio y se secó a 40 °C. De esta forma, la lignina obtenida se etiquetó como AAL para la extraída con DES AL-A, AHL para la extraída con DES AL-H y APL para la extraída con DES AL-P. El porcentaje de rendimiento de extracción de lignina en sólido fue calculado implementando la Ecuación (Ec.) (1) y (2), en donde se tuvo en cuenta el análisis composicional de la cáscara de cacao realizada por el grupo de investigación GIFTEX (ver Tabla 1). Cabe mencionar que para los cálculos se consideró únicamente el promedio del valor expresado, omitiendo su desviación estándar).

$$\text{Lignina en la muestra (g)} = \text{masa de la cáscara desencerada} * 32,73\% \quad \text{Ec. (1)}$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Lignina extraída (g)}}{\text{Lignina en la muestra (g)}} * 100 \quad \text{Ec. (2)}$$

4.3.3 Análisis cuantitativo de lignina en la cáscara de cacao deslignificada

Con el propósito de determinar el porcentaje de deslignificación de la cáscara de cacao por medio del tratamiento con el DES AL-P, se cuantificó la lignina presente en la cáscara de cacao deslignificada, de acuerdo al protocolo establecido por *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) (Sluiter et al., 2012). Sobre un baño en hielo, se agregaron 15 mL de ácido sulfúrico 72% frío a 1 g de cáscara de cacao deslignificada, pulverizada y tamizada con una malla 40. La adición se realizó de manera gradual, mientras se agitó y se maceró la muestra. Una vez dispersada la muestra, se mantuvo la solución a temperatura ambiente por 2 h con agitación continua, seguido de una dilución con 575 mL de agua. Posteriormente, se hirvió la solución por 4 h, conservando el volumen constante mediante la adición de agua caliente. Se dejó reposar hasta que la lignina suspendida en el solvente lograra asentarse completamente y se filtró realizando lavados con agua caliente. La lignina obtenida se secó a 40 °C por 12 h y finalmente, se determinó el porcentaje de deslignificación, usando las Ec. (3), (4) y (5).

$$\text{Lignina en la biomasa residual (g)} = 1 \text{ g de biomasa residual} * 32,73 \% \quad \text{Ec. (3)}$$

$$\% \text{ Lignina precipitada} = \frac{\text{Lignina obtenida (g)}}{\text{Lignina en la biomasa residual (g)}} * 100 \% \quad \text{Ec. (4)}$$

$$\% \text{ Deslignificación} = 100 \% - \% \text{ Lignina extraída} \quad \text{Ec. (5)}$$

4.4 Extracción de lignina con H₂O₂

Inicialmente, se preparó una solución de H₂O₂ 10 % p/p a pH 11,5 ajustado por adición gota a gota de NaOH 4 N, a la cual se le añadió Cdesencerada en una relación sólido:líquido 1:10 y se sometió a calentamiento de 70 °C por 2 h. Posteriormente, se filtró la solución con un filtro

de Nailon, separando así la cáscara de cacao deslignificada y la solución líquida (hemicelulosa y lignina).

Con el fin de sustraer la hemicelulosa del filtrado obtenido se agregó HCl 10% V/V gota a gota hasta pH 6 y se calentó a 40 °C para lograr la concentración de la solución. A continuación, se agregó etanol al 99% en relación líquido (solución)-líquido (alcohol) 1:3 con agitación constante por 1 h, generando finalmente la precipitación de la hemicelulosa que fue separada de la solución líquida por medio de filtración. El filtrado resultante se concentró calentando la solución a 40 °C y luego se añadió HCl 10% V/V hasta pH 1,5, obteniendo la lignina precipitada. Esta última se lavó con agua ácida (pH 2, ajustado con HCl 10%) y se secó a 40 °C por 24 h.

4.5 Caracterización

La cáscara de cacao desencerada, la lignina extraída de la cáscara de cacao por medio de cada método implementado (para la lignina extraída con DES, se usó el producto del experimento 3) y la lignina comercial (lignosulfonato de sodio) se analizaron por Difracción de Rayos X (DRX), Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR), Análisis Termogravimétrico (TGA) y Espectroscopía Ultravioleta Visible (UV-VIS). Los datos resultantes de cada análisis fueron tratados y representados gráficamente con la ayuda del programa OriginPro 2018.

4.5.1 Difracción de Rayos X (DRX)

Con el fin de corroborar la disminución en el contenido de lignina de la materia vegetal, los cambios generados por los tratamientos de extracción sobre la celulosa y la pureza de la lignina, se estudió la cristalinidad de la cáscara de cacao luego de cada tipo de tratamiento y se revisó el polimorfismo de la lignina APL, por medio de un difractómetro de Rayos X BRUKER D8

DISCOVER con una fuente de radiación CuK_α a kV y 30 mA, y un detector de área VANTEC-500.

El índice de cristalinidad (CrI) se calculó usando el método Segal, implementando la Ecuación (1)

$$CrI = \frac{I_{cr} - I_{am}}{I_{cr}} * 100 \quad \text{Ecuación (1)}$$

En donde I_{cr} es la intensidad máxima de la fase cristalina ($2\theta = 22-23$) e I_{am} es la intensidad en la fase amorfa situada alrededor de $2\theta = 18-19$.

4.5.2 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

Se implementó el análisis IR en la Cdesencerada, las ligninas, las cáscaras de cacao deslignificadas con cada DES implementado (experimento 3) y los DES para examinar los grupos funcionales que hacen parte de sus composiciones químicas. Se usó un espectrómetro infrarrojo Bruker, Tensor 27 usando el módulo de reflectancia total atenuada (ATR), con un rango de número de onda entre 4000 y 500 cm^{-1} .

4.5.3 Análisis Termogravimétrico (TGA)

Se estudió la estabilidad térmica de las ligninas de interés mediante el equipo STA 449 F5 Jupiter, en una atmósfera de nitrógeno que se mantuvo como flujo activo de arrastre de 60 mL/min. El análisis se realizó en un rango de temperatura de 100 a 600 °C y con una rampa de calentamiento de 10 °C/min.

4.5.4 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS)

El análisis espectroscópico UV-VIS se realizó en sólido, mediante el espectrómetro Thermo Scientific Evolution 300, en un rango de longitud de onda de 200-400 nm, región ultravioleta en donde suceden las transiciones características de anillos aromáticos. El análisis se realizó en la lignina APL (experimento 3), lignina a partir del tratamiento con H_2O_2 y la lignina comercial, para identificar las unidades esenciales o monómeros de lignina que prevalecen en sus composiciones.

5. Resultados

5.1 Extracción de lignina con el uso de DES

5.1.1 Síntesis del DES

La síntesis de los DES se caracterizó por la sencillez y celeridad de su proceso, contando con tiempos de formación de 13, 30 y 120 minutos para AL-A, AL-H y AL-P, respectivamente. Los DES sintetizados mantuvieron su homogeneidad después de 24 h de reposo a temperatura ambiente (ver muestra de ejemplo en la Figura 10), indicando que las condiciones de síntesis mostradas en la Tabla 4 fueron óptimas para su síntesis y uso como solventes de extracción. Los DES AL-A, AL-H y AL-P se caracterizaron por ser compuestos viscosos a simple vista y de carácter ácido con pH de 1,80, 1,31 y 2,80 respectivamente.

Figura 10

Muestra de DES AL-H



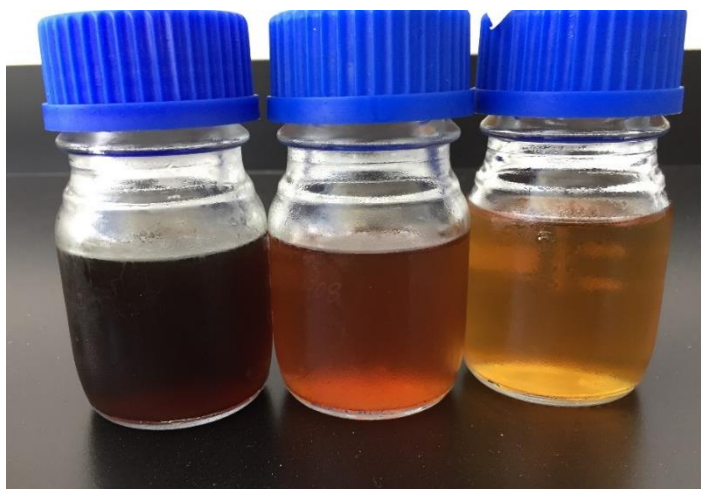
5.1.2 Extracción de lignina

Durante el proceso de extracción, la coloración del DES se tornó oscura (Figura 11) y con apariencia física de mayor viscosidad en comparación con el DES en su estado inicial (Malaek et

al., 2018), lo cual formó una solución difícilmente tratable a temperatura ambiente que mejoró su manejabilidad al ser manipulada en caliente y al agregar el antisolvente para la precipitación de lignina. Por esta razón, las temperaturas de filtración posteriores al tratamiento se mantuvieron conforme a las establecidas para cada experimento (ver Tabla 5).

Figura 11

Soluciones generadas a partir del tratamiento con AL-H y la adición de agua-etanol (1:1). En orden de izquierda a derecha experimento 8, 4 y 3.



5.1.2.1 Rendimientos de extracción. Los resultados del rendimiento de extracción de lignina en sólido obtenida por medio de los tratamientos con DES se muestran en la Tabla 6. Estos se asemejan a los valores reportados en la literatura generados a partir de tratamientos DES en diferentes biomásas. Por ejemplo, entre los máximos porcentajes de extracción de algunos reportes se encuentran: en el manojito de fruta vacía de palma de aceite, con el DES ácido láctico-cloruro de colina, 33,5 % (Tan et al., 2019b); rastrojo de maíz con ácido fórmico-cloruro de colina, 23.8 % (Xu et al., 2016); paja de arroz con ácido láctico-cloruro de colina y cloruro de colina-etilenglicol,

28,5 y 21.3 % respectivamente (Alvarez-Vasco et al., 2016); Sauce con cloruro de colina-ácido láctico de 22-52,4 % (T. Li et al., 2017); mazorca de maíz con cloruro de colina y úrea, 27,1 % (Procentese et al., 2015) y paja de trigo con ácido láctico-alanina 23,7% (Jablonsky et al., 2019).

La ausencia del rendimiento en los experimentos 8 y 10 con el DES AL-A, es debido a que no se logró obtener un producto con aspecto físico indicativo de lignina sólida. La viscosidad del DES y las condiciones severas de los experimentos, promovieron la formación de un compuesto muy viscoso que dificultó su proceso de extracción. Caso similar sucedió con la lignina extraída con el DES AL-H para los mismos experimentos que, aunque se logró finalmente obtener precipitado sólido, se percibieron aparentes impurezas (como la coprecipitación de solvente durante el proceso de aislamiento de la lignina) que estarían influyendo en el peso de la muestra y, por tanto, en su rendimiento. Posteriormente, el producto del experimento 8 con el DES AL-H fue caracterizado por medio de FT-IR, para comprobar la pureza de la muestra, encontrando rastros de celulosa y del DES AL-H (Apéndice A.). Teniendo en cuenta los aspectos anteriormente mencionados, el análisis de resultados se realizará principalmente prescindiendo de los rendimientos obtenidos con los experimentos 8 y 10.

Tabla 6

Rendimientos de extracción de lignina con DES AL-A, AL-H y AL-P, a partir de cada experimento.

Experimento	Relación	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Rendimiento (%)		
	sólido-líquido (g/10 mL)			AL-A	AL-H	AL-P
1	0,3	4	80	8,721	8,217	14,36
2	0,3	8	80	10,41	12,76	14,85
3	0,1	8	80	47,87	35,83	28,51

4	0,2	6	100	13,46	13,02	15,21
5	0,3	4	120	9,367	11,66	6,685
6	0,1	4	120	19,48	30,78	20,7
7	0,1	4	80	20,43	28,07	24,06
8	0,3	8	120	-	90,34	14,6
9	0,2	6	100	12,92	12,89	15,31
10	0,1	8	120	-	84,62	28,32
11	0,2	6	100	13,01	13,09	15,01

A partir de la Tabla 6 se puede observar que las extracciones con los diferentes DES presentan un comportamiento similar en cuanto a la relación entre los rendimientos y el tipo de DES para cada experimento. La diferencia sobre naturaleza del DES no ejerció una influencia significativa en los rendimientos de extracción. Se han reportado investigaciones que demuestran la relevancia en el solvente donador de enlaces de hidrógeno del DES para la extracción de lignina, en donde además, destacan al ácido láctico como funcional para este tipo de aplicaciones debido a la capacidad de romper los enlaces de la biomasa, gracias a sus protones (Z. Chen et al., 2020; Tan et al., 2019^a). Sin embargo, se logra evidenciar mediante el presente estudio, que manteniendo el ácido láctico como donador de enlaces de hidrógeno y variando el aceptor de enlaces de hidrógeno entre alanina, prolina e histidina, no se encuentra una variación significativa en los rendimientos de extracción.

Por otro lado, se observó que los efectos de las condiciones de tratamiento sí dieron lugar a cambios significativos en el rendimiento, razón por la cual se implementó el software

Statgraphics Centurion XVII para los modelos AL-H y AL-P, ya que contaban a cabalidad con los datos requeridos. Mediante estos análisis se determinó el modelo con AL-P como el más apropiado estadísticamente por su coeficiente de determinación más cercano al 100 %, estableciéndolo como base de análisis del presente estudio.

La Tabla 7 muestra la influencia de las variables estipuladas sobre los rendimientos de la lignina extraída en los experimentos, en donde se puede corroborar que, debido al valor P menor a 0,05, la relación sólido-líquido es la variable predominante sobre el rendimiento de obtención de lignina. Este factor podría estar relacionado con la mayor accesibilidad del DES para la interacción con la lignina (beneficiando la movilidad y difusividad en el solvente) y el aumento en la capacidad de formación de enlaces de hidrógeno que promueven el aislamiento de la lignina (T. Li et al., 2017; Malaeké et al., 2018; Tan et al., 2018). En la Figura 12 se muestra la superficie de respuesta estimada a una temperatura de 100 °C, la cual indica que a esta temperatura el mayor rendimiento se obtendría a menores relaciones sólido-líquido y mayor tiempo de exposición al tratamiento.

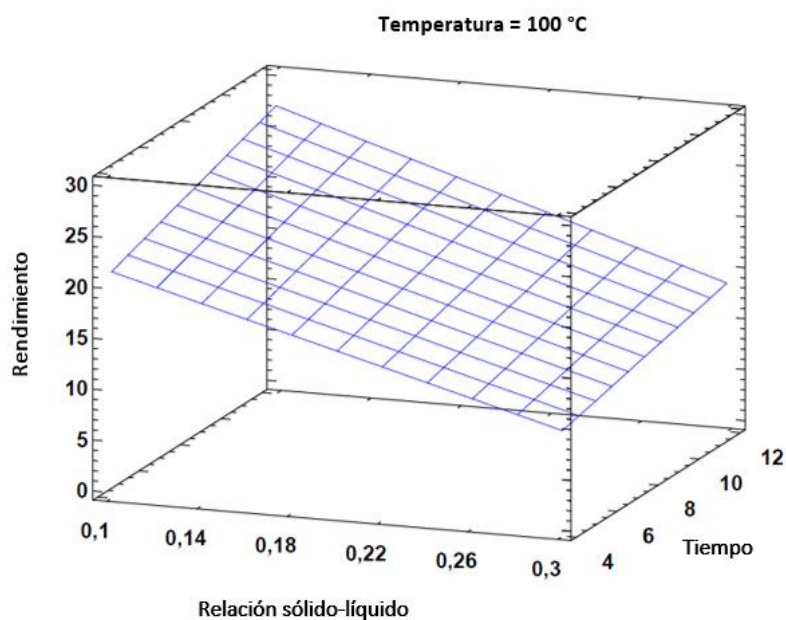
Tabla 7

Impacto de las variables estudiadas ante el rendimiento de extracción.

Variable	Razón F	Valor P
A: Relación sólido-líquido	37,97	0,0035
B: Tiempo	6,1	0,069
C: Temperatura	1,91	0,2386
AB	0,2	0,6813
AC	0,28	0,6257
BC	1,63	0,2705

Figura 12

Superficie de respuesta estimada para el rendimiento de extracción en base a las variables de relación sólido-líquido y tiempo.

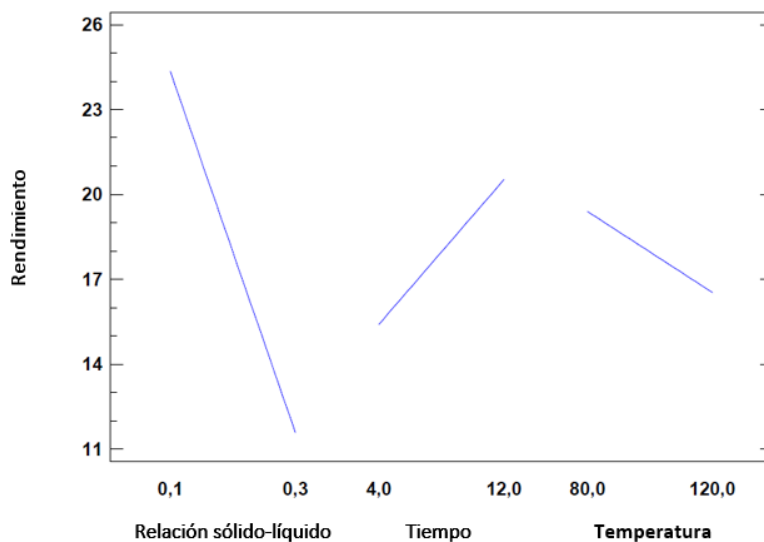


Así mismo, a través de la Figura 13 es posible observar la tendencia del rendimiento de lignina aislada ante cada variable. El tiempo de extracción muestra una tendencia directamente proporcional, concordando con estudios previamente reportados (Yujie Chen et al., 2019; T. Li et al., 2017; Tan et al., 2020b). Sin embargo, a diferencia de la literatura, la temperatura influyó de manera inversa en estos experimentos. Diferentes investigadores han hallado un efecto proporcional entre la temperatura y el rendimiento de extracción (Yujie Chen et al., 2019; Tan et al., 2020b); no obstante, este hecho se ve afectado por la alteración en el porcentaje de pureza de

la lignina extraída, debido a la degradación de celulosa que se logra con el tratamiento (Yujie Chen et al., 2019). Adicionalmente, se ha encontrado que existe cierto límite de temperatura óptimo para la extracción de lignina, ya que al aumentar su valor y someter la biomasa a condiciones más severas el rendimiento disminuye, razón por la cual, los autores del estudio sobre el uso de DES para la extracción de lignina de alta pureza, sugieren que el DES presenta una capacidad específica de deslignificación mientras se preserva la celulosa (Alvarez-Vasco et al., 2016). Cabe mencionar que la suficiencia de bajas temperaturas para el tratamiento contribuye en un proceso de menor gasto energético, siendo así más amigable con el medio ambiente y más económico.

Figura 13

Tendencias del rendimiento de extracción ante la influencia de las variables estudiadas.



5.1.3 Rendimiento de deslignificación

Para comprobar el rendimiento de extracción de lignina total de la cáscara de cacao, se realizó un análisis de cuantificación de lignina en la cáscara de cacao deslignificada del experimento 3 realizado con AL-P (experimento de mayor porcentaje de lignina precipitada), a

partir del cual se determinó un porcentaje de deslignificación del 84,6 %, valor similar a algunos resultados reportados de extracción con DES. Por ejemplo, con el DES cloruro de colina-ácido láctico se obtuvo para la madera de álamo, madera de eucalipto y el manojito de fruta vacía de palma de aceite 83, 82 y 88 %, respectivamente (Yujie Chen et al., 2019; Smink et al., 2019; Tan et al., 2018).

La cantidad de lignina aislada (28,51 %) es menor al total de la lignina solubilizada (84,6 %), debido a que gran parte del polímero se degrada durante el tratamiento a lignina de bajo peso molecular (basándose principalmente en la fragmentación de cadenas laterales), y ésta no vuelve a regenerarse (Yujie Chen et al., 2019). Sin embargo, es importante destacar que muchos estudios reportados concuerdan en que el proceso de deslignificación es debido a una despolimerización por la escisión de los enlaces éter β -O-4 inducida por el tratamiento con DES, que se lleva a cabo sin afectar los enlaces C-C de la lignina, es decir, sin alterar las unidades fundamentales del polímero (Z. Chen et al., 2020; Lyu et al., 2018; Smink et al., 2019; Tan et al., 2018; Tian et al., 2017).

5.2 Extracción de lignina con H_2O_2

La lignina aislada a partir de del blanqueamiento con peróxido de hidrógeno en la Cdesencerada, también se cuantificó por medio de gravimetría, dando como resultado un rendimiento del 10.8% que en comparación a los obtenidos por medio de DES, presenta un valor muy inferior.

El porcentaje de deslignificación en la cáscara de cacao implementando H_2O_2 no fue calculado en este trabajo; sin embargo, según reportes en donde se tratan biomásas como hojas de palma de aceite y madera de árbol de karité con H_2O_2 para la eliminación de lignina, se encuentran

porcentajes de deslignificación entre el 22 y 88% (Ayeni et al., 2013; Ho, Wu, et al., 2019). Cabe mencionar que en los casos reportados de mayor porcentaje de deslignificación, se halló una disminución en el porcentaje de lignina aislada en sólido, sugiriendo una degradación sustancial de la lignina en fragmentos solubles en agua (Ho, Ong, et al., 2019; Ovalle-Serrano et al., 2018; R. C. Sun et al., 2000). Por lo anterior podría deducirse que, sin tener en cuenta los impactos ambientales o económicos, el tratamiento con peróxido de hidrógeno es un proceso factible para la deslignificación de materia vegetal, pero de poca utilidad para la obtención de lignina.

5.3 Caracterización

5.3.1 Difracción de Rayos X (DRX)

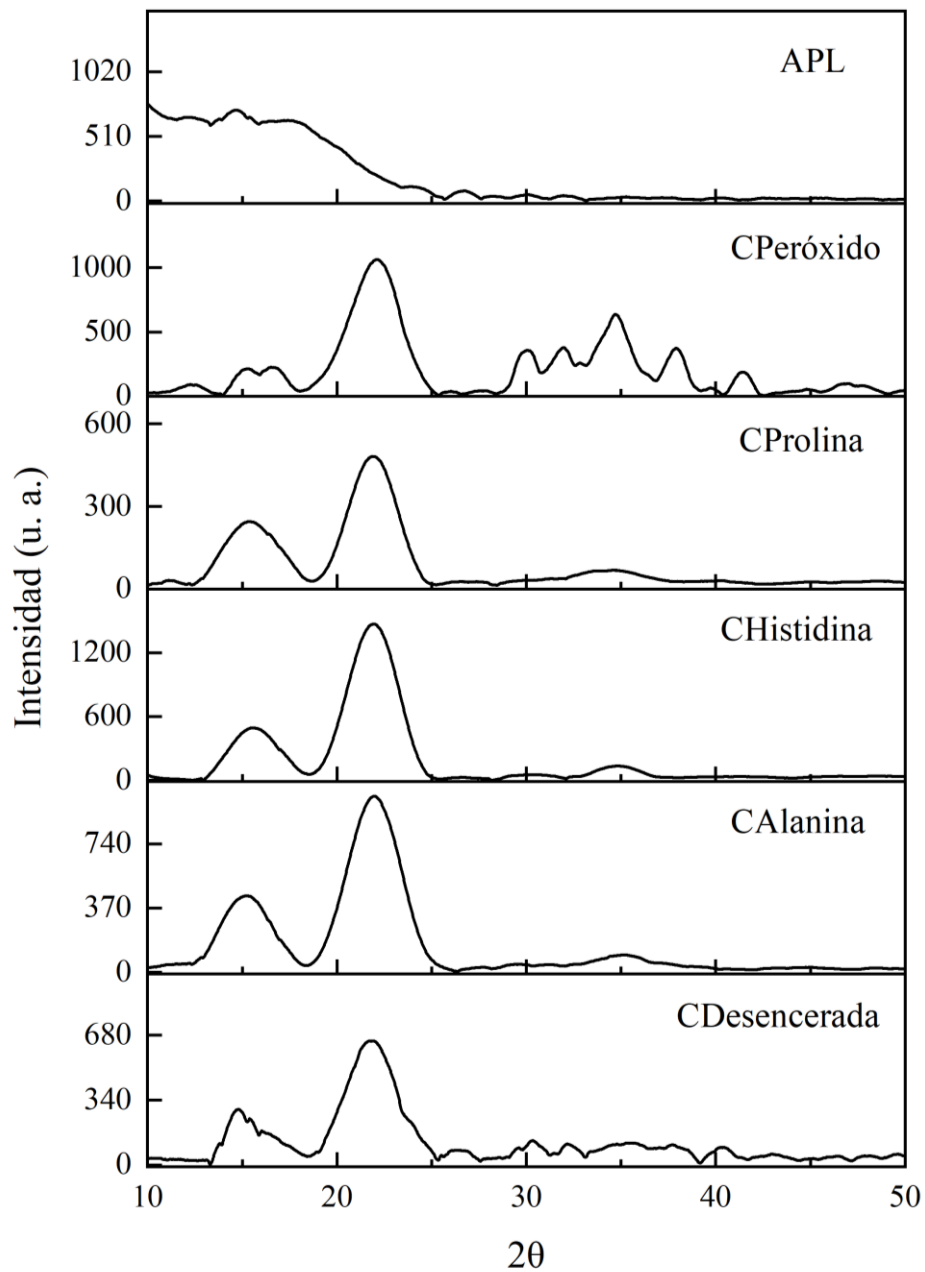
En la figura 14 se muestran los difractogramas de la cáscara de cacao seca, desencerada, deslignificada (experimento 3 con AL-A, AL-H, AL-P y tratamiento con H₂O₂) y, finalmente, la lignina obtenida con el DES AL-P. Tanto en la fuente de extracción como en la cáscara de cacao deslignificada a partir del tratamiento con DES se pueden identificar los picos en $2\theta = 15,6^\circ$, $22,0^\circ$ y $34,8^\circ$ característicos de la celulosa tipo I (Gong et al., 2017; Ovalle-Serrano et al., 2018; Quintero et al., 2016; Sèbe et al., 2012; Vaz, 2016). En el caso de la cáscara deslignificada con el uso de peróxido de hidrógeno, además de los picos significativos de celulosa tipo I, se observan picos en la zona de $2\theta = 30^\circ$ que son atribuidos a celulosa no cristalina (Jiang et al., 2021).

Por último, la lignina estudiada únicamente muestra una señal en $2\theta = 17,6$ mucho menos intenso y definido que los observados en los demás difractogramas; añadiendo que no presenta señales cristalinas, se comprueba su naturaleza amorfa y sustenta la pureza de la muestra (Alzagameem et al., 2018; Nair et al., 2016).

La cristalinidad de las muestras analizadas se determinó por medio de sus difractogramas, considerando la región amorfa (I_{am}) en $2\theta = 18-19$ y la zona cristalina en el máximo del pico más intenso $2\theta = 22-23$ (I_{200}) (Vaz, 2016). Los resultados mostraron que la Cdesencerada presenta un porcentaje de cristalinidad del 26,0%, valor que se asemeja al encontrado por Hernandez et al. en la cáscara de cacao (Hernández-Mendoza et al., 2021).

Figura 14

Perfiles de Difracción de Rayos X de cáscara de cacao desencerada (CDesencerada), cáscara de cacao deslignificada con DES AL-A (CAlanina), cáscara de cacao deslignificada con DES AL-H (CHistidina), cáscara de cacao deslignificada con DES AL-P (CProlina), cáscara de cacao deslignificada con H₂O₂ (CPeróxido) y la lignina extraída con DES AL-P (APL).



En comparación al porcentaje inicial (26,08 %), los valores correspondientes a la cáscara de cacao deslignificada aumentaron a 33,41 % en el menor de los casos y a 38,08 % en la muestra con mayor incremento (los porcentajes de cristalinidad de cada muestra analizada se especifican en la Tabla 8).

Este aumento se encuentra relacionado con la extracción de la lignina dado que se elimina material amorfo de la biomasa, corroborando así un óptimo proceso de deslignificación (Ovalle-Serrano et al., 2018). Anteriores reportes han sustentado la extracción de lignina selectiva por medio del tratamiento con DES, que no altera la composición de la celulosa ni afecta desfavorablemente su cristalinidad (Yujie Chen et al., 2019; Tian et al., 2017), lo cual amplifica la ventana de aprovechamiento de la biomasa vegetal con base en la celulosa remanente en la cáscara de cacao luego del tratamiento. Por otro lado, debido a que la deslignificación con peróxido de hidrógeno no sólo extrae la lignina presente en la biomasa sino también la hemicelulosa (Ovalle-Serrano et al., 2018; R. C. Sun et al., 2000), era de esperarse que su porcentaje de cristalinidad presentara un mayor valor.

Tabla 8

Índices de cristalinidad tomados a partir de los difractogramas de Rayos X

Muestra	Índice de Cristalinidad (%)
CDesencerada	26,08
CAlanina	33,41
CHistidina	34,43
CProlina	36,75
CPeróxido	38,08

5.3.2 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

5.3.2.1 Lignina extraída implementando DES. La figura 15 muestra una comparación entre los espectros FT-IR de la lignina obtenida a partir del tratamiento con DES AL-A, AL-H y

AL-P, mientras que la asignación de bandas se muestra en la Tabla 9. Según recientes estudios, el análisis FT-IR de la lignina se encuentra asociado no sólo a la información acerca de su pureza, sino que también, por medio de bandas características de sus espectros, permite la distinción de las unidades monoméricas que hacen parte de su composición química (Alzameem et al., 2018; Boeriu et al., 2004; Constant et al., 2016; Q. Zhang et al., 2020).

En general, los productos presentan señales comunes en 3268 y 2923 cm^{-1} , atribuidas a las vibraciones generadas por los enlaces O-H (tanto de alifáticos como de fenoles) y C-H (de los grupos metilo y metileno), respectivamente, señales de las cuales, puede apreciarse una mayor intensidad para APL. En la región de 1726 cm^{-1} , AAL Y APL muestran una señal débil y AHL un pico de intensidad media que es atribuida a las vibraciones de estiramiento del grupo carbonilo y éster no conjugado de los ácidos ferúlico y p-cumarico (Biswas et al., 2022; Vaz, 2016),

Las bandas características e indicativas de la lignina a causa de sus anillos aromáticos se observan en $1610-1619$, $1530-1542$ y $1444-10451\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a las vibraciones de los enlaces C=C, C-C y C-H respectivamente, en todas las ligninas analizadas (Alzameem et al., 2018; Yujie Chen et al., 2019; T. Li et al., 2017; Q. Zhang et al., 2020).

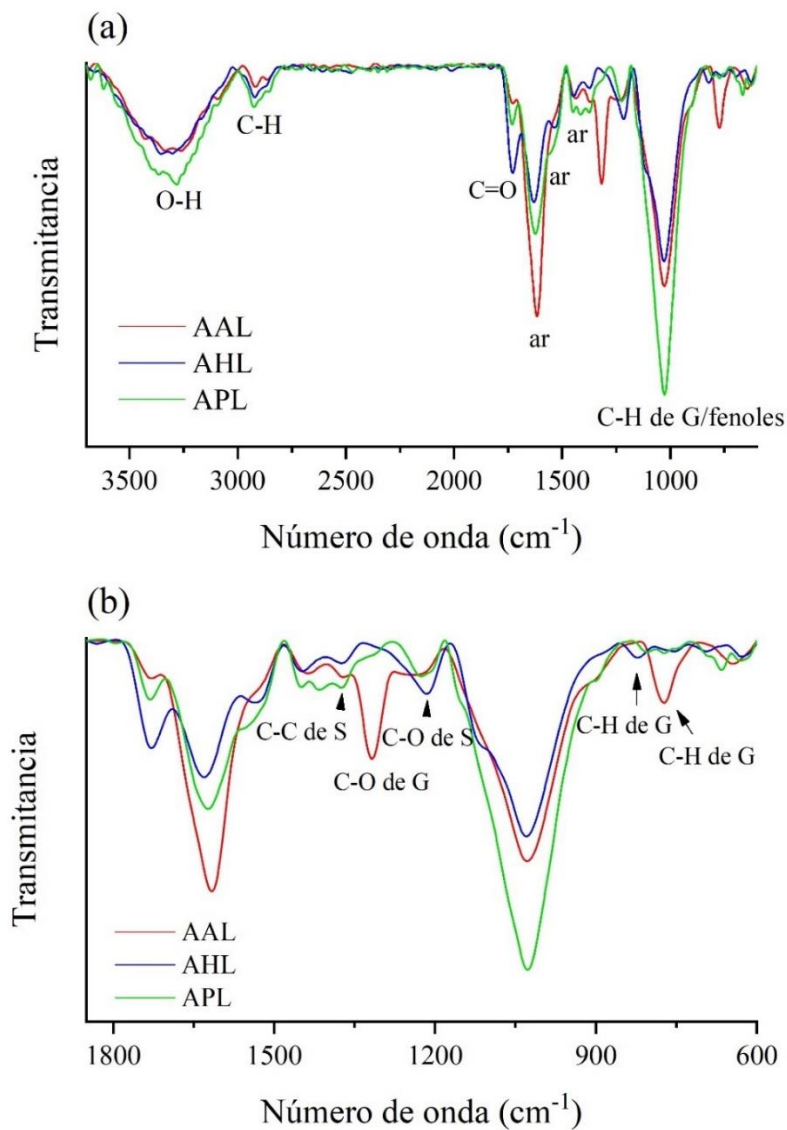
Las principales diferencias entre los espectros de las 3 ligninas radican en las intensidades y la presencia o ausencia de algunas bandas que determinan su composición monomérica. Por ejemplo, AAL presenta bandas débiles en 1369 y 1242 cm^{-1} asociadas a las vibraciones generadas por la unidad S y, a diferencia de las demás, muestra señales en 1318 y 790 cm^{-1} que son representativas del monómero G. Este último es corroborado por una banda intensa en 1028 cm^{-1} que, a su vez, indica la presencia de fenoles. En el caso de AHL se pueden apreciar bandas en 1374 , 1212 y 1120 cm^{-1} características de las unidades S y en 1030 y 823 cm^{-1} referentes a las unidades G. Por otro lado, APL presenta las bandas atribuidas a las unidades S y G/fenoles más

intensas que las demás en 1373 y 1030 cm^{-1} respectivamente. Además, se observan dos hombros ubicados en 1313 y 1152 cm^{-1} , que se atribuyen a la presencia de unidades H (El Hage et al., 2009; Q. Zhang et al., 2020).

Acorde a los resultados por espectroscopia IR es posible considerar que AAL está compuesta en mayor proporción por fenoles, unidades G y en una menor proporción por unidades S, mientras AHL y APL se componen principalmente por unidades G y S (en proporciones semejantes). No obstante, APL presenta adicionalmente una porción de unidades H.

Figura 15

Espectros IR de la lignina extraída usando los DES AL-A (AAL), AL-H (AHL) y AL-P (APL) en un rango número de onda de (a) 3700-600 cm^{-1} y (b) 1850 -600 cm^{-1}

**Tabla 9**

Asignación de las señales significativas del espectro FT-IR de AAL, AHL y APL

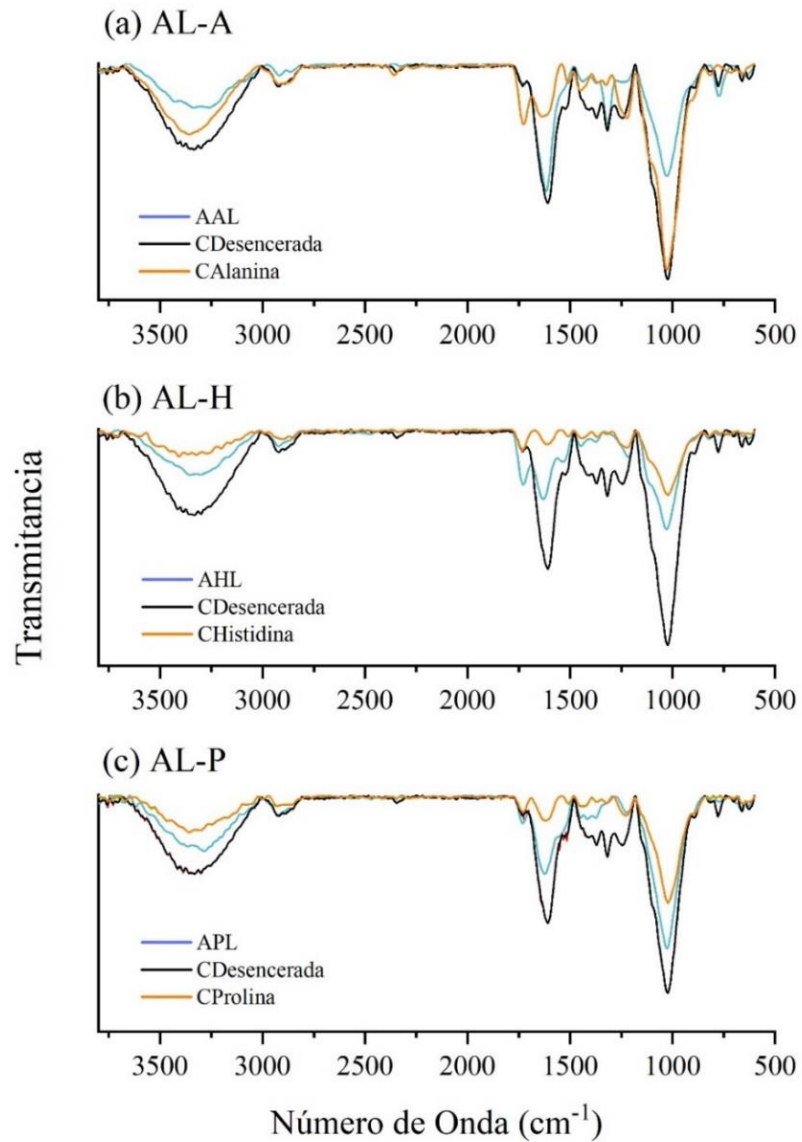
Número de onda (cm)			Asignación
AAL	AHL	APL	
3268	3268	3268	Vibración por estiramiento de O-H

2923	2928	2928	Vibración por estiramiento de C-H en grupos metilo y metileno
1726	1726	1726	Estiramiento de unidades C=O no conjugadas
1610	1625	1622	Estiramiento C=C del esqueleto aromático
1530	1532	1554	Vibraciones esqueleto C-C aromático
1444	1451	1450	Deformación del C-H por vibración del anillo aromático
1369 (débil)	1374	1373	Estiramientos C-C de unidades S
1318	-	-	Estiramientos C-O de unidades G
1225	1212	1222	Estiramiento de C-O de unidades S
-	1120	-	Estiramiento de C-H de unidades S
1028	1030	1030	Estiramiento de C-H de unidades G o fenoles
-	823	-	Estiramiento de C-H de unidades G
790	790	790	Vibraciones por la flexión C-H de unidades G
	(muy débil)	(muy débil)	

En la figura 16 se puede observar una comparación de los resultados espectroscópicos entre la Cdesencerada, la lignina extraída y la cáscara de cacao deslignificada obtenida a partir de los tratamientos con DES. Las bandas de las ligninas (AAL, AHL y APL) en 1615 y 1530 cm^{-1} indican que se mantuvo la estructura del anillo bencénico. En comparación con

Figura 16

Comparación entre los espectros IR de la cáscara desencerada, la lignina extraída y la cáscara de cacao deslignificada con cada uno de los tipos de DES (AL-A, AL-H y AL-P)



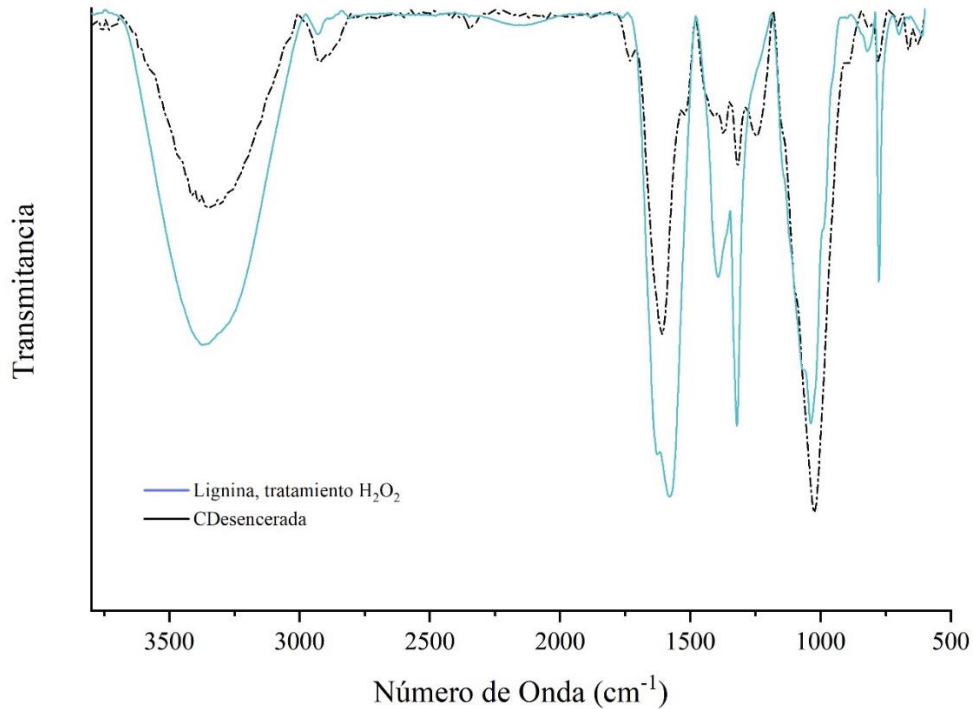
la CDesencerada, la disminución de las señales alrededor de 1600, 1510 y 1120 cm^{-1} en las cáscaras de cacao deslignificadas sugieren una alta remoción de lignina. La ausencia de los picos en 1426, 1240, 1082 cm^{-1} y alrededor de 900 cm^{-1} en AAL, AHL y APL, sugieren alta pureza en la lignina obtenida, ya que carece de la presencia de carbohidratos (Yujie Chen et al., 2019; T. Li et al., 2017; Ovalle-Serrano et al., 2018). Adicionalmente, en los espectros AAL, AHL y APL no se encontraron señales asociadas a los DES usados, lo cual indica que el proceso de extracción no afectó la pureza de la lignina (Apéndice B.).

De manera unificada, las ligninas AAL, AHL y APL se comparan gráficamente en el Apéndice C. con la Cdesencerada, la lignina obtenida por medio del tratamiento con H_2O_2 y la lignina comercial, para brindar una apreciación conjunta.

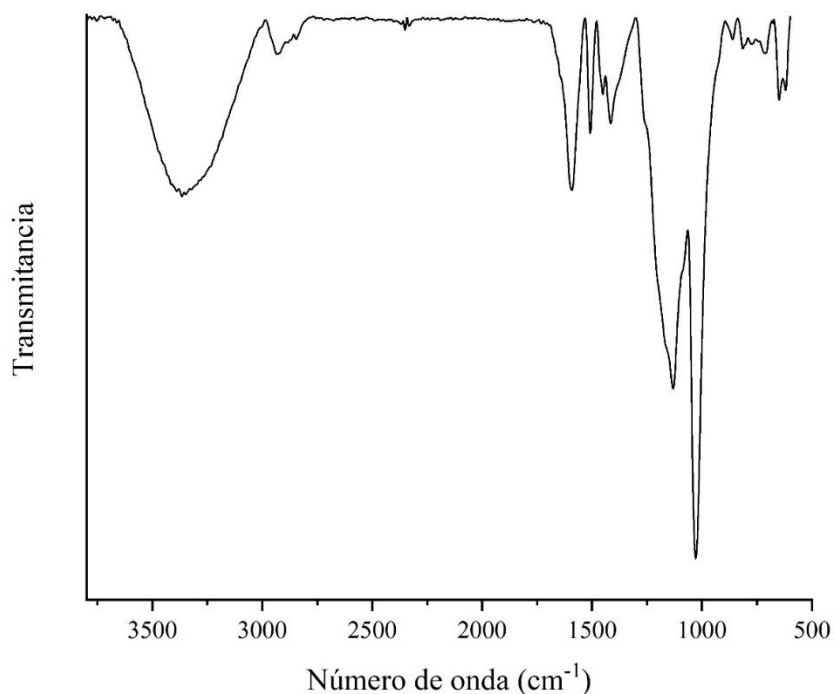
5.3.2.2 Lignina extraída implementando H_2O_2 . Al igual que en los productos anteriores, la lignina obtenida con peróxido de hidrógeno presenta señales en 3294, 2933 (debido a las vibraciones por los enlaces O-H y C-H respectivamente) y las bandas en 1400 y 1577 con un hombro en 1626 cm^{-1} (ver figura 17), estas últimas siendo clave para constatar el compuesto deseado, ya que representa las vibraciones generadas por el esqueleto aromático de la lignina, adicionalmente cuenta con bandas en 1318, 1037 y 780 cm^{-1} , que demuestra el rol predominante de la unidad G y/o fenoles en su composición, como se explicó anteriormente; sin embargo, la banda significativa en 1401 cm^{-1} y el pico en 1068 cm^{-1} sugiere la presencia de celulosa en la muestra (Yujie Chen et al., 2019; T. Li et al., 2017).

Figura 17

Espectro IR de la lignina obtenida mediante el tratamiento con H₂O₂



5.3.2.3 Lignina comercial. Además de las bandas características de los anillos aromáticos de la lignina ($1600\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$) y la presencia de fenoles en la misma (1033 cm^{-1}), la muestra comercial estudiada presenta dos picos que difieren a los espectros de las ligninas extraídas con DES (AAL, AHL y APL): el primero, de baja intensidad ubicado en 1413 cm^{-1} asociado a la existencia de carbohidratos en la lignina y, el segundo (que también se encuentra ausente en la lignina obtenida con H₂O₂), un pico demarcado e intenso en 1131 cm^{-1} que comprueba la presencia de los grupos sulfónicos (Bu et al., 2012) (ver figura 18). Cabe mencionar la previsibilidad de este último, teniendo en cuenta que la muestra se basa en un lignosulfonato de sodio, y que este tipo de lignina se caracteriza por la presencia de grupos sulfónicos que son formados mediante el tratamiento de extracción (método sulfito).

Figura 18*Espectro IR de la lignina comercial***5.3.3 Análisis Termogravimétrico (TGA)**

Las propiedades térmicas de la lignina comercial y de las obtenidas por medio de los tratamientos con los DES AL-A, AL-H, AL-P y peróxido de hidrógeno, se estudiaron por medio de análisis termogravimétrico. En la figura 19 se pueden apreciar las curvas TG y DTG resultantes. Cabe mencionar que, dada la estructura polimorfa heterogénea de la lignina y por tanto, la diferencia en la estabilidad térmica de sus diferentes grupos funcionales (dependiendo de la composición específica), ésta se descompone en un amplio rango de temperatura (Tan et al., 2020b).

La descomposición térmica de la lignina comercial, AAL y APL se dio principalmente entre 140 - 450 °C con una degradación más lenta hasta los 600 °C, en donde los picos de máxima pérdida de masa se dieron alrededor de 235 y 320 °C, similar a lo encontrado por otros autores

(María González Martínez et al., 2022; Lyu et al., 2019; yang et al., 2010). Este proceso dio lugar especialmente en dos fases. La primera, se desarrolló entre 130 y 280 °C, atribuida principalmente al rompimiento de los enlaces β -O-4 (ver Figura 5) (X.-Y. Li et al., 2021), esto es, la degradación de polímeros de bajo peso molecular, así como las cadenas laterales de la lignina, fenoles y derivados de fenoles. En segundo lugar, el rango de descomposición entre 280 y 600 °C se debe a la ruptura de los enlaces internos incluyendo reacciones de descarboxilación, descarbonilación y deshidrogenación (X.-Y. Li et al., 2021), que generan la formación de pequeñas moléculas volátiles (tales como, vanilina, isoeugneol, 4- vinilfenol, guayacol, siringol, entre otros) (M. González Martínez et al., 2019; María González Martínez et al., 2022; Lyu et al., 2019).

A diferencia de AAL y APL, la lignina comercial muestra un pico sobre los 100 °C que es debido a la pérdida de agua del ambiente y agua ligada a la lignina (W. Li et al., 2018). Además, la degradación dada en la segunda fase muestra dos picos consecutivos, de los cuales la señal a 257 °C difiere de las demás ligninas y es debido a la presencia de azufre en su estructura, así mismo el contenido de impurezas inorgánicas como el sodio (producto de su proceso de extracción), y el alto grado de degradación generado durante el proceso de pulpeo, influyen en el porcentaje de cenizas al final del tratamiento térmico, dando como resultado la mayor cantidad de residuo (58%) (Hemmilä et al., 2020; Majeke et al., 2021; Sahoo et al., 2011; Shao et al., 2017).

Pese a que la degradación de AHL ocurre el mismo rango de temperatura requerido para las ligninas anteriormente mencionadas, ésta presenta una tasa de degradación más lenta, que inicia alrededor de 220 °C y con un pico de máxima pérdida de masa en 313 °C, indicando mayor termoestabilidad y a su vez, menor cantidad de enlaces β -O-4, es decir, por medio del DES AL-H se logra una mayor despolimerización de la lignina. Estudios recientes han demostrado que la liberación de las moléculas fenol, guayacol, siringol (provenientes de las unidades principales de

la lignina, no sustituidos) y derivados de los mismos, en el polímero aislado inicia en 220 °C e incrementa al aumentar la temperatura; sin embargo, las unidades siringol y guayacol presentan mayor estabilidad térmica y se observan en temperaturas superiores, en especial esta última, de la que se sugiere una mayor estabilidad en los enlaces éter formados entre las unidades G (M. González Martínez et al., 2019; María González Martínez et al., 2022; Rowlandson et al., 2020) . Además, se ha reportado que las unidades guayacil son más propensas a reacciones de condensación iniciadas térmicamente, lo cual resulta en un alto contenido de cenizas al finalizar el tratamiento térmico en polímeros de lignina con gran porcentaje de unidades G (Rowlandson et al., 2020; Stark et al., 2016). En el caso de las ligninas extraídas con DES, AHL presentó en mayor contenido de residuo, seguida por APL y finalmente AAL con valores aproximados de 53, 38 y 27%, respectivamente.

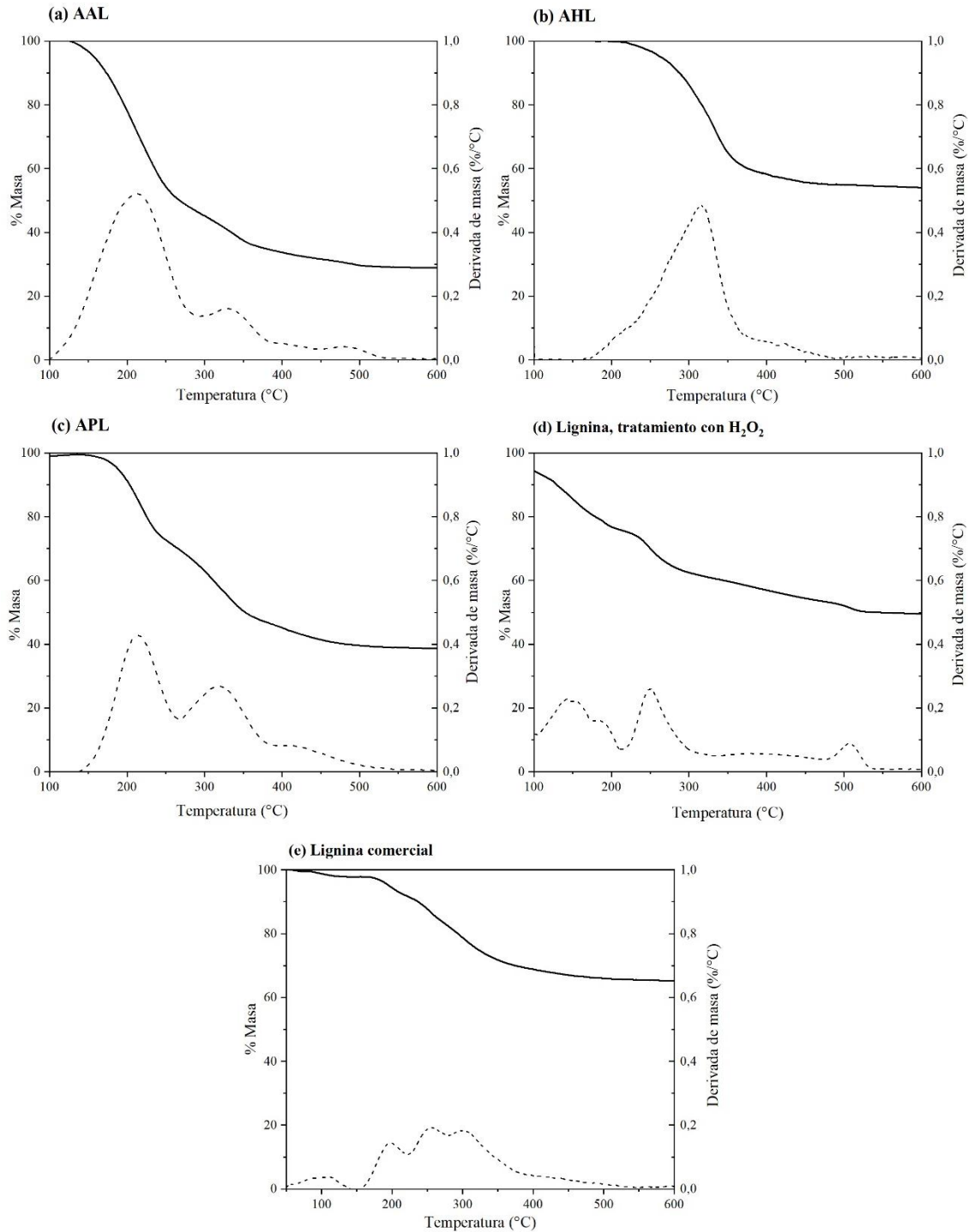
Lo observado por medio del análisis termogravimétrico concuerda con las señales IR obtenidas (en cuanto a las unidades H, G y S que conforman sus estructuras), brindando información acerca de la especificidad en la composición de las ligninas estudiadas. Así, para el caso de las ligninas extraídas con DES es posible sugerir que AAL se compone en gran manera por unidades fenólicas y en menor cantidad por unidades G, APL presenta las 3 unidades monoméricas base de la lignina en proporciones significativas y, por último, AHL se compone principalmente por unidades G y S.

Finalmente, la lignina extraída con peróxido de hidrógeno muestra una rápida degradación térmica y una notoria diferencia referente a los demás resultados termogravimétricos con un pico en 507 °C que puede ser debido a la repolimerización durante la etapa de calentamiento que se degrada nuevamente a una temperatura más alta (de França Serpa et al., 2020). Por ejemplo, González M. et al., encontraron fenoles en temperaturas similares (400-600 °C) y sugieren que es

debido a derivados de lignina tipo G formados a través de su desmetoxilación y mediante reacciones secundarias (M. González Martínez et al., 2019).

Figura 19

Curvas de degradación térmica (TGA y DTG) de AAL, AHL, APL, lignina extraída mediante el uso de H_2O_2 y comercial.



Los resultados de los análisis FTIR y TGA sobre AAL, AHL y APL infieren claramente en una dependencia estructural de la lignina ante el tipo de DES implementado para la extracción.

Diversos estudios han reportado la influencia de la acidez o alcalinidad del DES sobre el rendimiento de extracción y la composición de la lignina, encontrando una mayor despolimerización en DES ácidos, atribuido a la catalización del protón en el rompimiento de enlaces β -O-4, así como la posterior repolimerización de lignina en una estructura más condensada, especialmente entre unidades G (H. Li et al., 2021; Liu et al., 2020; Wang et al., 2022), concordando con los resultados del presente estudio en donde el DES de menor pH fue AL-H y con el cual se obtuvo lignina de alta proporción en unidades G y menor cantidad de enlaces β -O-4 (dado el rango de degradación térmica). De manera similar, se ha encontrado relación entre la lignina extraída y 1. los pKa de los componentes DES individualmente (Tan et al., 2019a), 2. la estructura química de los mismos (por ejemplo, cíclica o lineal) (Z. Chen et al., 2020). Sin embargo, aún se requieren estudios sobre el mecanismo de reacción y los factores influyentes en la variación del compuesto aceptor de enlaces de hidrógeno del DES sobre la lignina extraída (Jablonsky et al., 2019; Kumar et al., 2016).

5.3.4 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS)

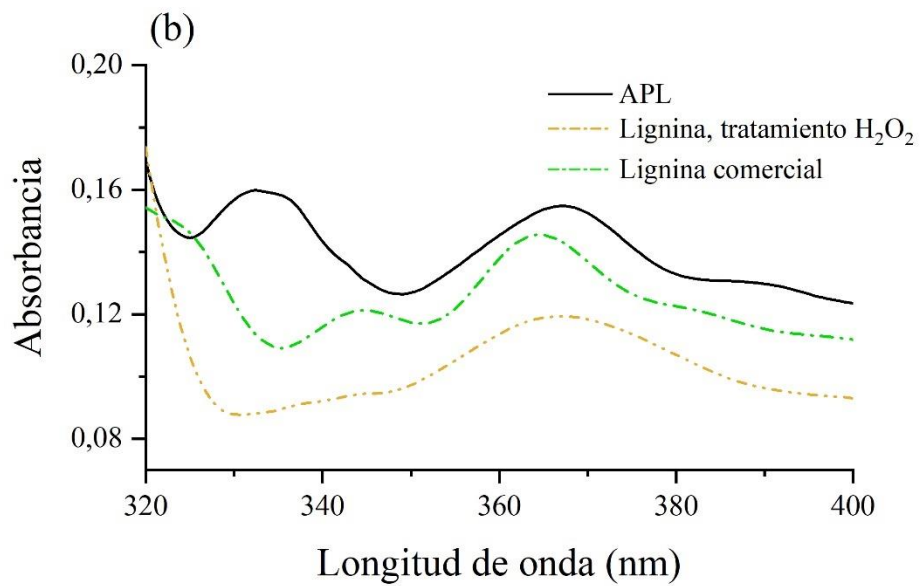
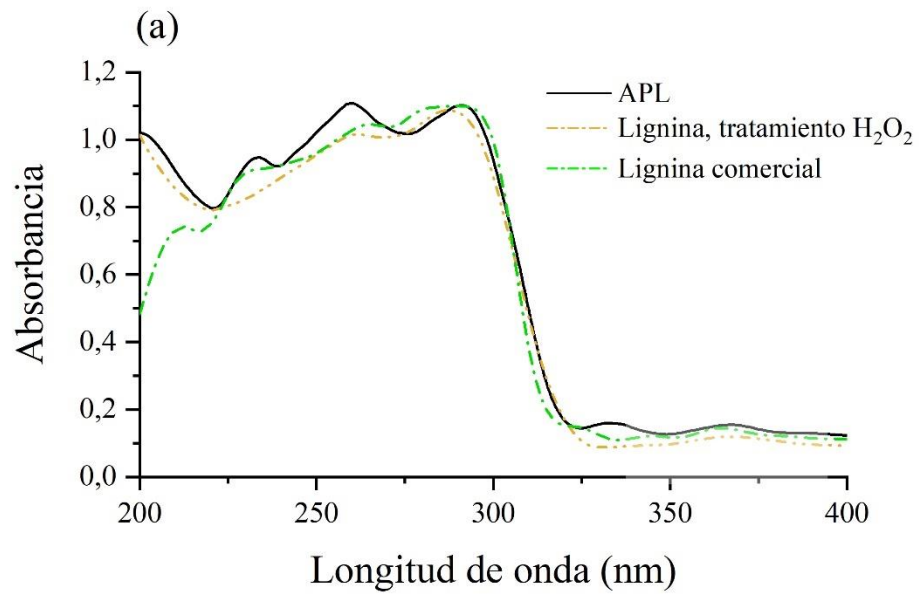
La Técnica analítica UV-VIS permite relacionar con más claridad la proporción de los componentes de la lignina y comparar su pureza (H. Zhang et al., 2020). El espectro UV para ALP, la lignina extraída con H₂O₂ y comercial se muestran en la figura 20.

La zona entre 200-220 nm se atribuye a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ de los anillos aromáticos (-C=C-) y el pico en 230 nm es debido a anillos aromáticos mono y di sustituidos (-OCH₃, -HO, -OAr, etc) (Singh & Dhepe, 2016). En los 3 casos se pueden observar bandas generadas por las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de compuestos fenólicos no conjugados, ubicados en 268 y 286 nm, los cuales son característicos de las unidades S y G, respectivamente (El Hage et al., 2009; M.-F. Li et al., 2012; Singh & Dhepe, 2016; R. C. Sun et al., 2000).

En el caso de APL y la lignina comercial, es posible evidenciar bandas cerca de 328 nm, representativa de unidades H y en 365 nm, correspondiente a estructuras fenólicas conjugadas (como el ácido ferúlico) (Stark et al., 2016). Las intensidades de las bandas de APL indican proporciones similares entre las unidades G y S (concordando con los resultados de las técnicas analíticas anteriormente estudiadas) y, en menor cantidad, la presencia de unidades H. No obstante, su señal es más intensa que las otras ligninas al igual que en las demás bandas, indicando mayor concentración de las unidades monoméricas en su estructura y, por tanto, mayor pureza en comparación con la lignina extraída con H_2O_2 (Figura 20 (b)).

Figura 20

Espectro UV-VIS de APL, lignina extraída mediante el uso de H_2O_2 y comercial en (a) un rango de longitud de onda 200-400 nm y (b) de 320-400 nm.



6. Conclusiones

En términos de rendimiento y pureza, el uso de solventes eutécticos es un método eficiente para la deslignificación de la cáscara de cacao, así como la obtención de lignina aislada en comparación a métodos convencionales como lo son el uso de peróxido de hidrógeno y el método Sulfito. Además, la clasificación del método como “verde”, la selectividad del solvente y la facilidad del proceso son factores adicionales que incrementan la aceptación y preferencia del tratamiento ante este tipo de aplicaciones.

A pesar de que se usó la misma fuente de biomasa e incluso el mismo método de extracción, pero con diferente tipo de DES, la composición de la lignina extraída varió, indicando la importancia en la naturaleza del solvente ante cada tratamiento. Aun así, a través de análisis instrumentales se logró sugerir que la lignina presente en la cáscara de cacao es del tipo HGS, con predominancia sobre las unidades GS.

En cuanto a la cáscara de cacao desencerada, fue posible observar mediante DRX que la extracción de lignina con DES no perjudicó la celulosa presente en la biomasa (refiriéndose a su índice de cristalinidad).

7. Recomendaciones

Para futuras investigaciones, se recomienda realizar un diseño experimental para la extracción de lignina con DES implementando rangos de temperatura más bajos y tiempos de calentamiento más prolongados (que presenten diferencias bajas entre sus valores consecutivos), con la finalidad de estudiar la posible optimización del aislamiento de lignina en términos de rendimiento.

Así mismo, se sugiere el estudio acerca de la influencia de las variables de tiempo, temperatura y relación sólido-líquido sobre la composición de la lignina en la cáscara de cacao, en donde además se lleve a cabo la caracterización del producto por medio de técnicas analíticas que provean información más detallada sobre su composición química, como 2D-NMR.

Por último, se propone una investigación más detallada de los DES, que permita verificar los aspectos fundamentales (composicionales) de éstos, en la interacción con la lignina de la cáscara de cacao, de tal manera que se logre elegir adecuadamente el tipo de DES según las necesidades estructurales deseadas para el producto de extracción.

Referencias

- [1] A. Sluiter, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter A and Templeton D 2008 Determination of Extractives in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date 7/17/2005 - 42619.pdf *Tech. Rep. NREL/TP-510-42619* 1–9
- [2] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D and Crocker D 2012 Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass - NREL/TP-510-42618 *Lab. Anal. Proced.* 17
- [3] Tan Y T, Ngoh G C and Chua A S M 2018 Evaluation of fractionation and delignification efficiencies of deep eutectic solvents on oil palm empty fruit bunch *Ind. Crops Prod.* **123** 271–7
- [4] Chen Z, Ragauskas A and Wan C 2020 Lignin extraction and upgrading using deep eutectic solvents *Ind. Crops Prod.* **147** 112241
- [5] Tan Y T, Ngoh G C and Chua A S M 2019 Effect of functional groups in acid constituent of deep eutectic solvent for extraction of reactive lignin *Bioresour. Technol.* **281** 359–66
- [6] Malaeke H, Housaindokht M R, Monhemi H and Izadyar M 2018 Deep eutectic solvent as an efficient molecular liquid for lignin solubilization and wood delignification *J. Mol. Liq.* **263** 193–9
- [7] Li T, Lyu G, Liu Y, Lou R, Lucia L, Yang G, Chen J and Saeed H 2017 Deep Eutectic Solvents (DESs) for the Isolation of Willow Lignin (*Salix matsudana* cv. Zhuliu) *Int. J. Mol. Sci.* **18** 2266
- [8] Tan Y T, Chua A S M and Ngoh G C 2020 Evaluation on the properties of deep eutectic solvent-extracted lignin for potential aromatic bio-products conversion *Ind. Crops Prod.* **154** 112729
- [9] Chen Y, Zhang L, Yu J, Lu Y, Jiang B, Fan Y and Wang Z 2019 High-purity lignin isolated from poplar wood meal through dissolving treatment with deep eutectic solvents *R. Soc. Open Sci.* **6** 181757

- [10] Tian D, Chandra R P, Lee J-S, Lu C and Saddler J N 2017 A comparison of various lignin-extraction methods to enhance the accessibility and ease of enzymatic hydrolysis of the cellulosic component of steam-pretreated poplar *Biotechnol. Biofuels* **10** 157
- [11] Alvarez-Vasco C, Ma R, Quintero M, Guo M, Geleynse S, Ramasamy K K, Wolcott M and Zhang X 2016 Unique low-molecular-weight lignin with high purity extracted from wood by deep eutectic solvents (DES): a source of lignin for valorization *Green Chem.* **18** 5133–41
- [12] Smink D, Juan A, Schuur B and Kersten S R A 2019 Understanding the Role of Choline Chloride in Deep Eutectic Solvents Used for Biomass Delignification *Ind. Eng. Chem. Res.* **58** 16348–57
- [13] Lyu G, Li T, Ji X, Yang G, Liu Y, Lucia L and Chen J 2018 Characterization of Lignin Extracted from Willow by Deep Eutectic Solvent Treatments *Polymers (Basel)*. **10** 869
- [14] Ho M C, Ong V Z and Wu T Y 2019 Potential use of alkaline hydrogen peroxide in lignocellulosic biomass pretreatment and valorization – A review *Renew. Sustain. Energy Rev.* **112** 75–86
- [15] Sun R C, Fang J M and Tomkinson J 2000 Delignification of rye straw using hydrogen peroxide *Ind. Crops Prod.* **12** 71–83
- [16] Ovalle-Serrano S A, Blanco-Tirado C and Combariza M Y 2018 Exploring the composition of raw and delignified Colombian fique fibers, tow and pulp *Cellulose* **25** 151–65
- [17] Ho M C, Wu T Y, Chee S W Q, Ngang C Y, Chew I M L, Teoh W H, Md. Jahim J and Mohammad A W 2019 An application of low concentration alkaline hydrogen peroxide at non-severe pretreatment conditions together with deep eutectic solvent to improve delignification of oil palm fronds *Cellulose* **26** 8557–73
- [18] Ayeni A O, Hymore F K, Mudliar S N, Deshmukh S C, Satpute D B, Omoleye J A and Pandey R A 2013 Hydrogen peroxide and lime based oxidative pretreatment of wood waste to enhance enzymatic hydrolysis for a biorefinery: Process parameters optimization using response surface methodology *Fuel* **106** 187–94
- [19] Sèbe G, Ham-Pichavant F, Ibarboure E, Koffi A L C and Tingaut P 2012 Supramolecular

- Structure Characterization of Cellulose II Nanowhiskers Produced by Acid Hydrolysis of Cellulose I Substrates *Biomacromolecules* **13** 570–8
- [20] Vaz S 2016 *Analytical Techniques and Methods for Biomass* ed S Vaz (Cham: Springer International Publishing)
- [21] Quintero J A, Dávila J A, Moncada J, Giraldo O H and Cardona Alzate C A 2016 Análisis y caracterización de materiales amiláceos y celulósicos después de modificación enzimática *DYNA* **83** 44
- [22] Gong J, Li J, Xu J, Xiang Z and Mo L 2017 Research on cellulose nanocrystals produced from cellulose sources with various polymorphs *RSC Adv.* **7** 33486–93
- [23] Zaman M, Bajwa R I, Qureshi O S, Rehman A U, Saeed S, Amjad M W, Ghafoor Raja M A and Hussain M A 2021 Synthesis of Thiol-Modified Hemicellulose, Its Biocompatibility, Studies, and Appraisal as a Sustained Release Carrier of Ticagrelor *Front. Pharmacol.* **12** 1–15
- [24] Mohtar S S, Tengku Malim Busu T N Z, Md Noor A M, Shaari N and Mat H 2017 An ionic liquid treatment and fractionation of cellulose, hemicellulose and lignin from oil palm empty fruit bunch *Carbohydr. Polym.* **166** 291–9
- [25] Alzagameem A, Khaldi-Hansen B, Büchner D, Larkins M, Kamm B, Witzleben S and Schulze M 2018 Lignocellulosic Biomass as Source for Lignin-Based Environmentally Benign Antioxidants *Molecules* **23** 2664
- [26] Nair V, Dhar P and Vinu R 2016 Production of phenolics via photocatalysis of ball milled lignin–TiO₂ mixtures in aqueous suspension *RSC Adv.* **6** 18204–16
- [27] Hernández-Mendoza A G, Saldaña-Trinidad S, Martínez-Hernández S, Pérez-Sariñana B Y and Láinez M 2021 Optimization of alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis of cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.) for ethanol production *Biomass and Bioenergy* **154** 106268
- [28] Zhang J, Wang Y, Zhang L, Zhang R, Liu G and Cheng G 2014 Understanding changes in cellulose crystalline structure of lignocellulosic biomass during ionic liquid pretreatment by XRD *Bioresour. Technol.* **151** 402–5

- [29] Zhang Q, Li H, Guo Z and Xu F 2020 High Purity and Low Molecular Weight Lignin Nano-Particles Extracted from Acid-Assisted MIBK Pretreatment *Polymers (Basel)*. **12** 378
- [30] Boeriu C G, Bravo D, Gosselink R J A and van Dam J E G 2004 Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy *Ind. Crops Prod.* **20** 205–18
- [31] Constant S, Wienk H L J, Frissen A E, Peinder P De, Boelens R, van Es D S, Grisel R J H, Weckhuysen B M, Huijgen W J J, Gosselink R J A and Bruijninx P C A 2016 New insights into the structure and composition of technical lignins: a comparative characterisation study *Green Chem.* **18** 2651–65
- [32] El Hage R, Brosse N, Chrusciel L, Sanchez C, Sannigrahi P and Ragauskas A 2009 Characterization of milled wood lignin and ethanol organosolv lignin from miscanthus *Polym. Degrad. Stab.* **94** 1632–8
- [33] Bu L, Xing Y, Yu H, Gao Y and Jiang J 2012 Comparative study of sulfite pretreatments for robust enzymatic saccharification of corn cob residue *Biotechnol. Biofuels* **5** 87
- [34] Lyu G, Wu Q, Li T, Jiang W, Ji X and Yang G 2019 Thermochemical properties of lignin extracted from willow by deep eutectic solvents (DES) *Cellulose* **26** 8501–11
- [35] González Martínez M, Anca Couce A, Dupont C, da Silva Perez D, Thiéry S, Meyer X and Gourdon C 2022 Torrefaction of cellulose, hemicelluloses and lignin extracted from woody and agricultural biomass in TGA-GC/MS: Linking production profiles of volatile species to biomass type and macromolecular composition *Ind. Crops Prod.* **176** 114350
- [36] González Martínez M, Ohra-aho T, Tamminen T, da Silva Perez D, Campargue M and Dupont C 2019 Detailed structural elucidation of different lignocellulosic biomass types using optimized temperature and time profiles in fractionated Py-GC/MS *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **140** 112–24
- [37] Li W, Amos K, Li M, Pu Y, Debolt S, Ragauskas A J and Shi J 2018 Fractionation and characterization of lignin streams from unique high-lignin content endocarp feedstocks *Biotechnol. Biofuels* **11** 304
- [38] Majeke B M, Collard F-X, Tyhoda L and Görgens J F 2021 The synergistic application of

- quinone reductase and lignin peroxidase for the deconstruction of industrial (technical) lignins and analysis of the degraded lignin products *Bioresour. Technol.* **319** 124152
- [39] Shao Y, Guizani C, Grosseau P, Chaussy D and Beneventi D 2017 Thermal characterization and kinetic analysis of microfibrillated cellulose/lignosulfonate blends *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **124** 25–34
- [40] Stark N M, Yelle D J and Agarwal U P 2016 Techniques for Characterizing Lignin *Lignin in Polymer Composites* (Elsevier) pp 49–66
- [41] de França Serpa J, de Sousa Silva J, Borges Reis C L, Micoli L, Alexandre e Silva L M, Canuto K M, Casimiro de Macedo A and Ponte Rocha M V 2020 Extraction and characterization of lignins from cashew apple bagasse obtained by different treatments *Biomass and Bioenergy* **141** 105728
- [42] Zhang H, Wang X, Wang J, Chen Q, Huang H, Huang L, Cao S and Ma X 2020 UV–visible diffuse reflectance spectroscopy used in analysis of lignocellulosic biomass material *Wood Sci. Technol.* **54** 837–46
- [43] Singh S K and Dhepe P L 2016 Isolation of lignin by organosolv process from different varieties of rice husk: Understanding their physical and chemical properties *Bioresour. Technol.* **221** 310–7
- [44] Li M-F, Sun S-N, Xu F and Sun R-C 2012 Formic acid based organosolv pulping of bamboo (*Phyllostachys acuta*): Comparative characterization of the dissolved lignins with milled wood lignin *Chem. Eng. J.* **179** 80–9

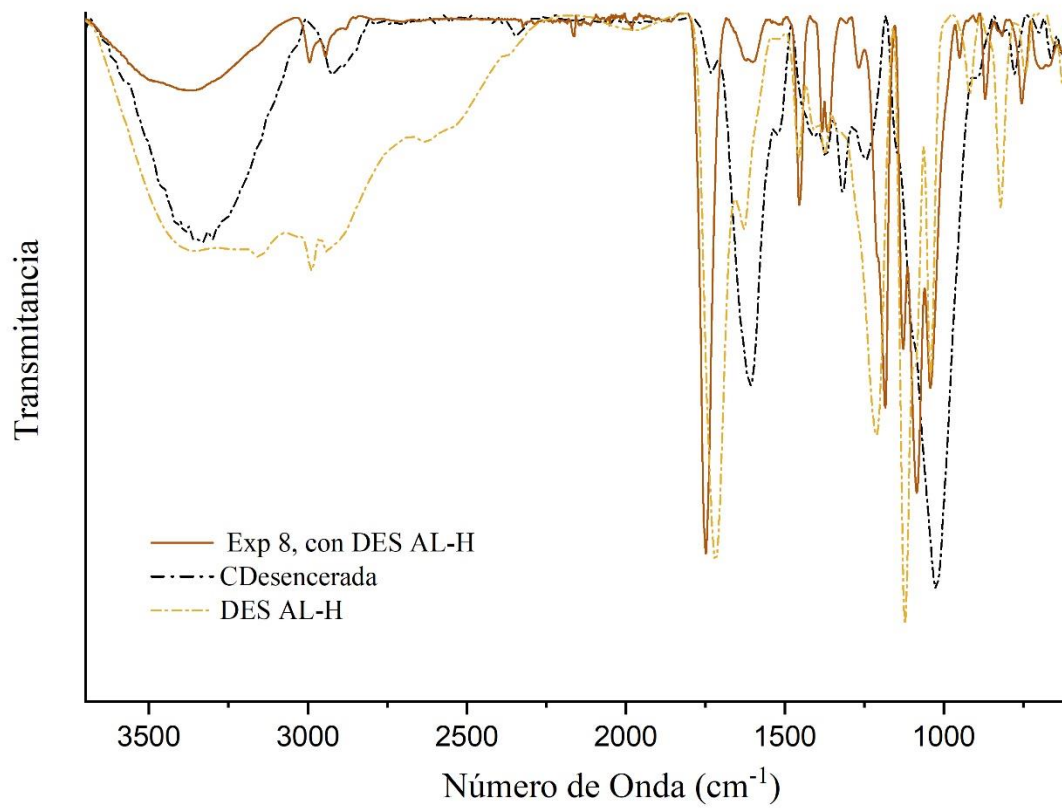
Apéndices

Apéndice A. Caracterización FT-IR, producto a partir del experimento 8 con el DES AL-H

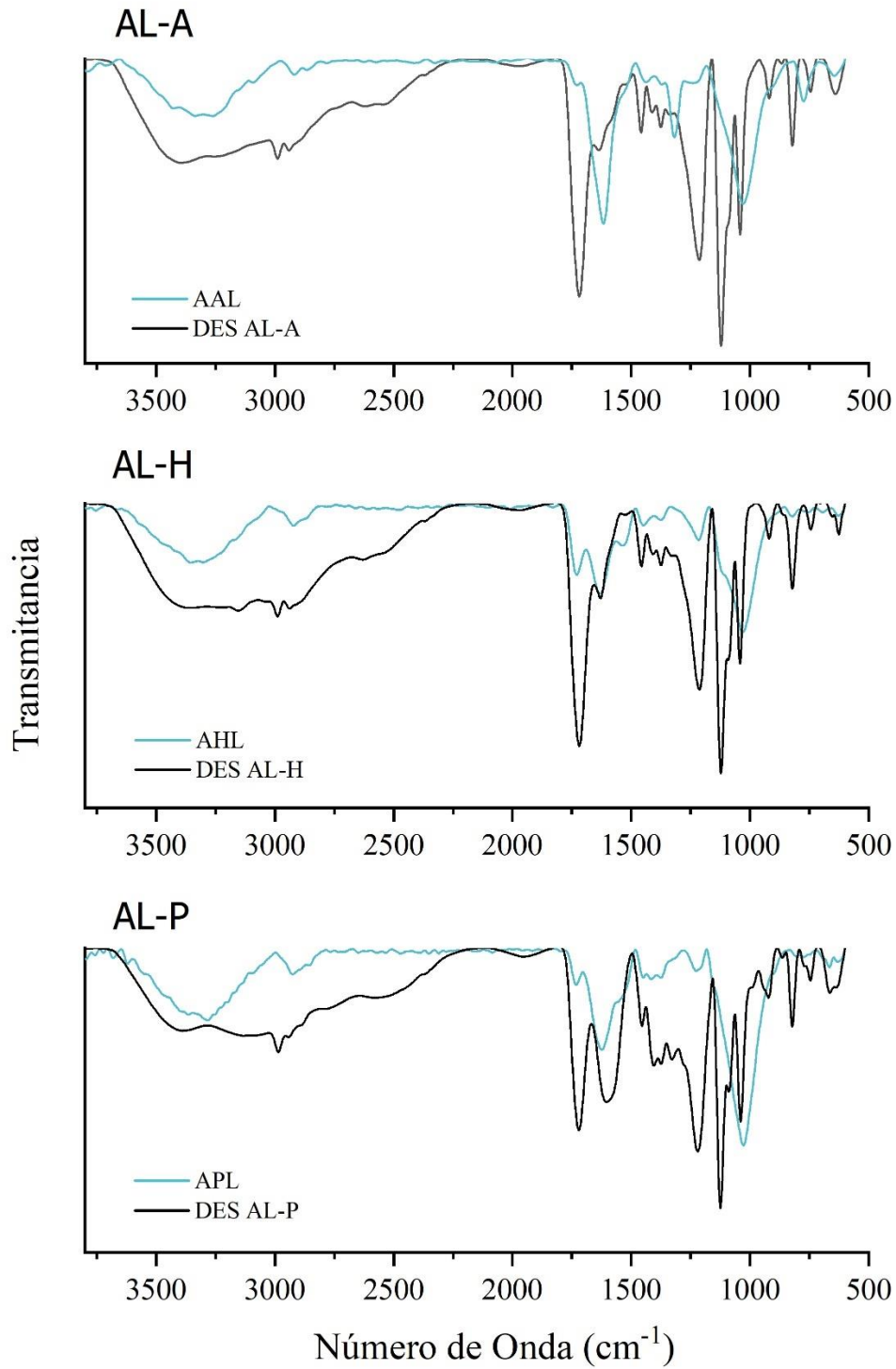
La Figura 21 muestra el espectro FT-IR del producto mediante el experimento 8 con el solvente AL-H, comparado con el espectro IR de la Cdesencerada y del DES AL-H. Es posible observar que, las bandas correlacionadas a la lignina no se presentan de forma clara, en comparación a las ligninas extraídas con DES estudiadas previamente (experimento 3: AAL, AHL y APL), las señales representativas de los anillos aromáticos alrededor de 1600, 1530 y 1450 cm^{-1} se encuentran con menor intensidad, adicionalmente presenta bandas por las cuales su ausencia en los demás espectros de lignina se atribuía a evidencia sobre su pureza, esto es, en 1246, 1182, 1081 y 940 cm^{-1} correspondientes al estiramiento del enlace C-O (de -C-O-H), estiramiento asimétrico del puente -C-O-C-, vibración por el enlace C-O-C del anillo piranosa y los enlaces β -glucosídicos respectivamente, siendo éstos propios del polímero celulosa (Barshan et al., 2019; Belgacem & Gandini, 2008; T. Li et al., 2017; Vaz, 2016). Cabe mencionar que, como se puede observar en la Figura 21, algunas señales entre el producto obtenido y el DES AL-H concuerdan en posición e intensidad, tales como 1752 o 1040 cm^{-1} , generadas por las vibraciones de los enlaces C=O y C-O respectivamente (Vaz, 2016), y que a su vez, difieren de las señales generadas por la Cdesencerada sugiriendo la posibilidad de que dichas bandas sean debidas a la presencia de DES en la muestra.

Figura 21.

Espectros IR de la Cdesencerada, el DES AL-H y el producto obtenido mediante el experimento 8 con AL-H.



Apéndice B. Comparación entre los espectros IR de AAL, AHL y APL con los DES AL-A, AL-H y AL-P respectivamente



Apéndice C. Comparación entre los espectros IR de AAL, AHL y APL con (a) lignina comercial, (b) lignina obtenida mediante el tratamiento con H_2O_2 y (c) lignina comercial.

