

Procesamiento hidrotérmico como alternativa para la valorización de la cáscara de cacao
(*Theobroma cacao*) en Santander según el concepto de biorefinería

Marialejandra Herrera Rincón y Yessica Paola Rojas Patiño

Trabajo de grado para optar el título de Ingeniero Químico

Directora

Viviana Sánchez Torres

Ingeniera química, PhD.

Codirectoras

Laura Plazas Tovar; y Laura Johana Castellanos Suárez

Ingeniera Química, PhD; e Ingeniera Química, MSc.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2022

Dedicatoria

A Dios por darme la fortaleza y la perseverancia en este proceso.

A mis papás y a mi hermanito, por su apoyo incondicional en esta etapa de mi vida, los amo.

A mis amigos y a Jireh, por hacer más ameno y satisfactorio el camino.

Y a Paola, por su leal y cariñosa compañía.

-Marialejandra Herrera

A Dios por su incondicionalidad, fortaleza y amor.

A mi madre, ángel que me guía, acompaña y me llena de motivación.

A mi papá y a mi hermana por su apoyo constante y amor, por ser mi fuente de inspiración.

Y a Marialejandra por lo vivido en este tiempo de altos y bajos.

- Paola Rojas

-

Agradecimientos

A la profesora Viviana Sanchez Torres, directora del proyecto, por compartir de su conocimiento, por su dedicación y orientación.

A la profesora Laura Plazas Tovar por guiarnos y enfocarnos, compartir de su tiempo y conocimiento.

A la ingeniera Laura Johana Castellanos por su instrucción y dedicación a lo largo del proyecto.

Al Centro Agropecuario SENA, al laboratorio de fisicoquímica por disponer de sus equipos para el desarrollo del proyecto, y a la instructora del laboratorio de microbiología por proveernos de los equipos faltantes.

Al Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología.

Al GIMBA por proveernos de materiales, y del espacio para la conservación de las muestras.

A Angélica Rangel por su apoyo y orientación.

A Fernando Cáceres y Marly Pinto, por su dedicación, guía e instrucción en los procesos del laboratorio, además de hacer más amena las jornadas.

A Paula, Silvia, Karoll, Sebastián, Jennifer, Daniela, Yireth, Diana, Nicolás, Salomé y Daniel, por ser grandes amigos, compañeros de estudio, confidentes y hacer de la vida universitaria más enriquecedora.

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	11
1. Objetivos	13
1.1. Objetivo general.....	13
1.2. Objetivos específicos.....	13
2. Estado del arte.....	14
3. Metodología	16
3.1. Caracterización de la cáscara de cacao	17
3.1.1. Secado	17
3.1.2. Cuantificación de cenizas y extractivos	18
3.1.3. Cuantificación de lignina y carbohidratos estructurales.....	19
3.2. Combinación Pretratamientos	20
3.3. Cuantificación de Azúcares Reductores	21
3.4. Pretratamiento Hidrotérmico.....	22
3.4.1. Diseño de experimentos.....	22
3.4.2. Análisis estadístico	23
3.4.3. Optimización pretratamiento hidrotérmico	24
4. Resultados	24
4.1. Resultados caracterización	24

4.2. Resultados combinación de pretratamientos.....	25
4.3. Resultados pretratamiento alcalino-hidrotérmico.....	26
5. Conclusiones	31
6. Recomendaciones	32
Referencias bibliográficas.....	33
Apéndices.....	37

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Diseño experimental pretratamiento hidrotérmico	22
Tabla 2. Resultados del diseño experimental, pretratamiento hidrotérmico.....	26
Tabla 3. Efectos estimados, ANOVA	27
Tabla 4. Parámetros de ajuste del modelo de regresión.....	27

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Diagrama de la metodología.....	17
Figura 2. Secado cáscara de cacao en marquesina.....	18
Figura 3. Superficie de respuesta	28
Figura 4. Perfiles de deseabilidad	31

Lista de apéndices

	Pág.
Apéndice A. Ecuaciones para el cálculo de la composición porcentual	37
Apéndice B. Tabla caracterización fisicoquímica de la cáscara de cacao	38
Apéndice C. Método del DNS	39
Apéndice D. Curvas de calibración HPLC	41
Apéndice E. Cromatograma HPLC caracterización	43
Apéndice F. Cromatograma HPLC del hidrolizado del sólido resultante de las alternativas de pretratamiento	44

Resumen

Título: Procesamiento hidrotérmico como alternativa para la valorización de la cáscara de cacao (*Theobroma Cacao*) en Santander según el concepto de biorefinería*

Autores: Marialejandra Herrera Rincón y Yessica Paola Rojas Patiño**

Palabras claves: residuo agrícola, cáscara de cacao, azúcares, pretratamiento hidrotérmico, pretratamiento alcalino.

Descripción:

En Colombia se producen más de 70 mil toneladas de cacao anualmente, donde el grano aprovechable constituye tan sólo el 11% del fruto. La cáscara, que actualmente es un residuo agrícola, representa del 70 al 75% en peso total. Su alto contenido de azúcares reductores lo constituyen en un residuo de interés como potencial fuente de azúcares C6 y C5. Sin embargo, debido a su alto contenido de lignina es necesario aplicar pretratamientos para su aprovechamiento. Este proyecto de investigación tiene como fin determinar las condiciones que favorecen el fraccionamiento de la cáscara de cacao en sus compuestos fundamentales (celulosa, hemicelulosa y lignina) acoplando procesos de conversión química y física (alcalino e hidrotérmico). Para esto, se caracterizó la cáscara de cacao CCN51 proveniente de Santander siguiendo el protocolo NREL/TP-510-42618, siendo su composición porcentual de 39.35% de extractivos, 22.31% de lignina, 14.14% de celulosa, y 10.66% de ceniza. Se realizaron las tres diferentes alternativas de pretratamiento (hidrotérmico, hidrotérmico-alcalino y alcalino-hidrotérmico) a 180°C y 8min para el pretratamiento hidrotérmico y las condiciones optimizadas del pretratamiento alcalino (concentración de NaOH de 0.65% p/v, concentración de sólidos de 11.27% p/v, a 117 °C durante 1 h), resultando que la mejor alternativa es el pretratamiento alcalino-hidrotérmico. Posteriormente, se realizó un diseño experimental del tipo central compuesto, donde las variables independientes a evaluar fueron el tiempo (5 – 10 min) y la temperatura (165 – 185 °C) sobre la variable de respuesta (azúcares reductores), y se optimizaron los resultados a partir de la función deseabilidad. Para las condiciones de 189.14 °C y 3.96 min se obtuvo la mayor concentración de azúcares reductores liberados en el hidrolizado (27.96 g/L). Siendo el rendimiento del pretratamiento de 0.61 g azúcares reductores/g cáscara seca.

* Trabajo de grado.

** Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora: PhD. Viviana Sánchez Torres. Codirectoras: PhD. Laura Plazas Tovar y MSc. Laura Johana Castellanos.

Abstract

Title: Hydrothermal Processing as an Alternative for the Valorization of Cocoa Husks (*Theobroma cacao*) in Santander According to the Biorefinery Concept*

Authors: Marialejandra Herrera Rincón y Yessica Paola Rojas Patiño**

Keywords: agricultural residue, cocoa shell, sugars, hydrothermal pretreatment, alkaline pretreatment.

Description:

More than 70 thousand tons of cocoa are produced in Colombia, where the usable bean constitutes only 11% of the fruit. The husk, which is currently an agricultural residue, represents 70 - 75% of the total weight and, its high content of reducing sugars makes it an interesting residue as a potential source of C6 and C5 sugars. However, due to its high lignin content, it is necessary to apply pretreatments for its utilization. This research project aims to determine the conditions that favor the fractionation of the cocoa shell into its fundamental compounds (cellulose, hemicellulose and lignin) by coupling chemical and physical conversion processes (alkaline and hydrothermal). For this purpose, CCN51 cocoa pod husk from Santander were characterized following the NREL/TP-510-42618 protocol, obtaining percentage composition of 39.35% extractives, 22.31% lignin, 14.14% cellulose, and 10.66% ash. The three different pretreatment alternatives (hydrothermal, hydrothermal-alkali and alkaline-hydrothermal) were performed at 180°C and 8min for the hydrothermal pretreatment. Therefore, the optimized alkaline pretreatment conditions (a NaOH concentration of 0.65% w/v, solids concentration of 11.27% w/v, at 117 °C for 1 h), resulting that the best alternative is the alkaline-hydrothermal pretreatment. Subsequently, a central composite experimental design was performed, where the independent variables to be evaluated were time (5 - 10 min) and temperature (165 - 185 °C) on the response variable (reducing sugars). Finally, the results were optimized from the desirability function, where for the conditions of 189.14 °C and 3.96 min, the highest concentration of reducing sugars were obtained in the liquid, resulting as the best pretreatment alternative (alkaline-hydrothermal) corresponding to a 27.96 g/L concentration. Being the pretreatment yield 0.61 g reducing sugars/ g dry shell.

* Bachelor Thesis.

** Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Advisor: PhD. Viviana Sánchez Torres. Co-advisors: PhD. Laura Plazas Tovar y MSc. Laura Johana Castellanos.

Introducción

El cacao es un cultivo destinado principalmente a la obtención de granos como materia prima para la producción de chocolate y grasas para las industrias alimentarias y cosmetológicas (Ángel et al., 2017). En Colombia se produjeron 70.205 toneladas de cacao en el último año cacaotero (octubre 2020 a septiembre de 2021), donde Santander participó con aproximadamente el 41% de la producción nacional, con una cifra de 28.785 toneladas de cacao en grano (Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales, 2021).

El grano aprovechable constituye tan sólo el 11% en peso del fruto. La cáscara, que actualmente es un residuo agrícola, representa del 70 al 75% en peso total (Cruz et al., 2012). Actualmente en Colombia, la cáscara de cacao es habitualmente quemada, o se descompone al aire libre en las plantaciones lo que ocasiona la proliferación de organismos patógenos precursores de enfermedades como la “mazorca negra” para el caso del *Phytophthora spp*, y la “escoba de bruja” para el *Moniliophthora perniciosa*, ocasionando pérdidas de productividad de hasta un 80% (Ángel et al., 2015; Phillips y Cerda, 2011).

A su vez, la cáscara está compuesta principalmente por lignina (22.63% p/p) y carbohidratos estructurales (celulosa (15.30% p/p) y hemicelulosa (7.16% p/p)), extractivos totales (38.44% p/p), y cenizas (6.38% p/p) (Ávila y Díaz, 2020). El alto contenido de lignina hace necesario emplear procesos de deslignificación impactando a la recuperación de los carbohidratos estructurales para la posterior conversión en productos de alto valor agregado como los biocombustibles (incluidos etanol, hidrógeno y metano) y biomateriales (como varias enzimas, lactatos, acetatos y ácidos orgánicos) (Sharma et al., 2017; Xu et al., 2017).

Entre los pretratamientos con tal objetivo se encuentran el proceso de conversión biológico utilizando hongos, enzimas y bacterias que están vinculados con la deslignificación debido a la

presencia de enzimas peroxidasas y oxidativas (Cheah, 2020), y el proceso químico realizado mediante bases alcalinas (NaOH , KOH , e Ca(OH)_2), bases ácidas (H_2SO_4 , HNO_3 , H_3PO_4 , HCl) (Cheah, 2020) y el acoplamiento de procesos alcalino e hidrotérmicos (Rivera, 2018).

Éstos últimos serán objeto del presente estudio, dado que se ha obtenido resultados promisorios con los materiales cáscara de banano y caña de azúcar, obteniendo hasta un 79%-80% de celulosa (Rivera, 2018). Sin embargo, la cáscara de cacao no cuenta con estudios concluyentes para aplicar las mejores condiciones del proceso en su aprovechamiento. Debido a lo anterior se plantea estudiar, ¿Qué condiciones favorecen el fraccionamiento de la cáscara de cacao en sus componentes fundamentales (celulosa, hemicelulosa y lignina) acoplando procesos de conversión química y física (alcalino e hidrotérmico) apuntando a la obtención de azúcares reductores en el hidrolizado?

Además, este proyecto es parte de la línea de investigación “Aprovechamiento integral de productos subproductos y residuos agroindustriales” del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA).

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Definir las condiciones que favorecen el fraccionamiento de la cáscara de cacao en sus componentes fundamentales y posterior producción de azúcares fermentables acoplando procesos de conversión química y física (alcalino e hidrotérmico).

1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar fisicoquímicamente las cáscaras de cacao provenientes de Santander.
- Cuantificar la cantidad de azúcares reductores en el hidrolizado resultante de la aplicación de los pretratamientos (hidrotérmico, hidrotérmico-alcalino, y alcalino-hidrotérmico).
- Evaluar a través de un diseño de experimentos las condiciones del proceso del pretratamiento hidrotérmico de la cáscara de cacao sobre la obtención de azúcares reductores en el hidrolizado.

2. Estado del arte

Los problemas de contaminación ambiental a nivel mundial han aumentado gradualmente el interés de la investigación en el valor de la biomasa lignocelulósica, proveniente de residuos de la producción de industrias agrícolas. Esta biomasa es un recurso natural abundante, útil para la producción de bioenergía, químicos y productos por su naturaleza renovable (Anwar et al., 2014). Una de las aplicaciones con mayor potencial consiste en obtener azúcares fermentables, para ser utilizados posteriormente en la obtención de biocombustibles, biosurfactantes, entre otros bioproductos; siendo estos la base del futuro desarrollo de biorrefinerías (Kumar et al., 2011).

La biorrefinería se define según International Energy Agency-IEA como “el tratamiento sostenible de la biomasa para la obtención de un espectro de productos y energías comercializables” (Bell et al., 2014). Es decir, se basa principalmente en el empleo de la biomasa como suministro principal, la producción de variedad de productos y crear una plusvalía. Así, se encuentra una amplia gama de tratamientos con la capacidad de fraccionar la biomasa lignocelulósica en sus componentes fundamentales, y transformarlos en productos con un valor agregado.

La biomasa lignocelulósica se considera un compuesto de fibrillas de celulosa, unidos mediante una matriz conformada por lignina y hemicelulosa. Las microfibrillas o fibrillas son largas cadenas lineales unidas por fuerzas de Van der Waals intramoleculares y puentes de hidrógeno, haciendo que estos carbohidratos complejos no puedan fermentarse directamente, por lo que deben sufrir un proceso de pretratamiento, con el fin de reducir la presencia de compuestos y enlaces que dificulten la etapa posterior de hidrólisis y el desarrollo de la fermentación. Así pues, el objetivo del pretratamiento es la preparación y disposición de la materia prima para obtener el

máximo rendimiento en el proceso de producción, reduciendo la cristalización de la celulosa y disociando el complejo lignina-celulosa (Rodríguez, 2016).

El pretratamiento aplicado depende de las características del producto a obtener y por su naturaleza se dividen en: físicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos. A su vez, los físicos son secado, trituración mecánica, ultrasonidos, radiación de alta energía y pretratamiento con microondas. Por otro lado, los fisicoquímicos incluyen explosión con vapor, tratamiento con agua caliente en fase líquida e hidrotérmico. Por otra parte, los químicos, que solubilizan la lignina, son tratamientos con ozono, oxidación húmeda, hidrólisis alcalina y tratamiento con organosolventes. Y, por último, el biológico, en el cual se emplean microorganismos para la degradación de la lignina y hemicelulosa (Rodríguez, 2016).

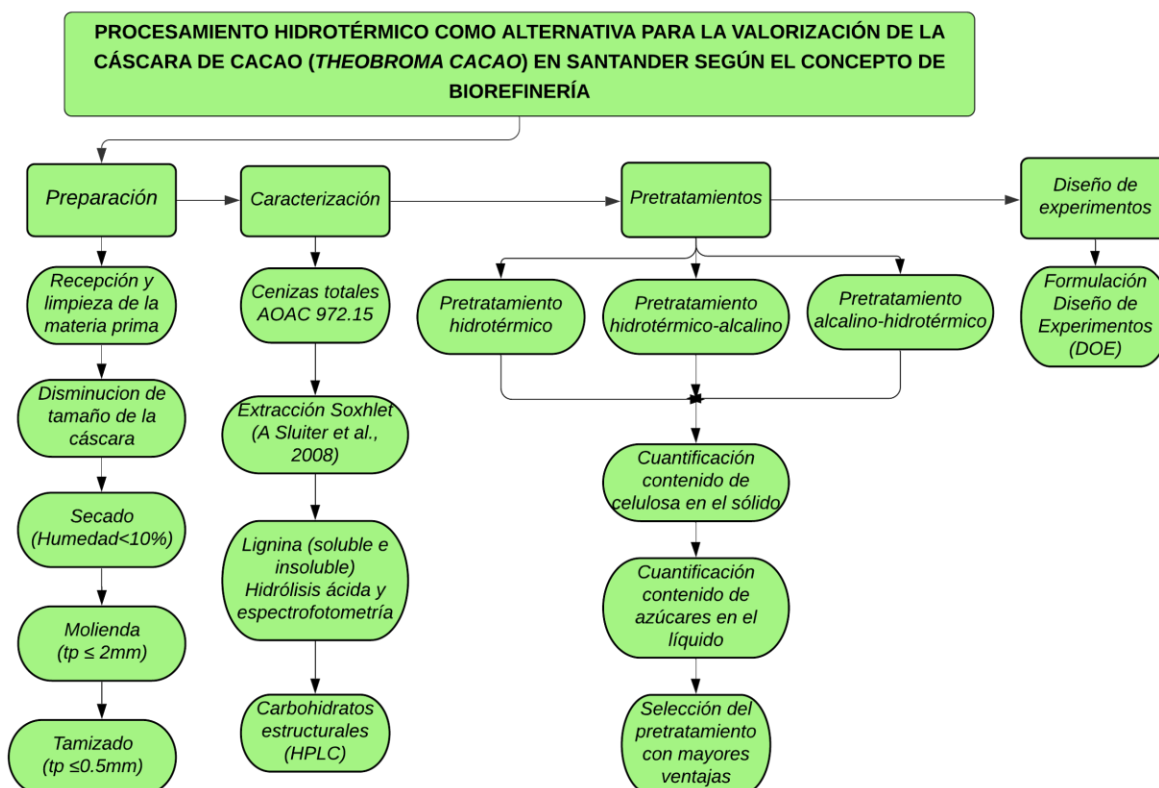
En el grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA) se realizó un trabajo previo (Ávila y Díaz, 2020) sobre el pretratamiento alcalino de la cáscara de cacao para remover la lignina en el que se determinaron las mejores condiciones con hidróxido de sodio, y generaron una propuesta metodológica para la hidrólisis enzimática de cáscara de cacao CCN51. Para el pretratamiento, realizaron un diseño experimental del tipo central compuesto, variando la concentración de NaOH (0.55 - 2.07% p/v), concentración de sólidos (14 - 22% p/v) y la temperatura (50 – 100 °C), y estas fueron optimizadas mediante el empleo de la función deseabilidad. De esta manera, el porcentaje óptimo de degradación de lignina encontrado fue de 80.59%, estimado a una concentración de NaOH de 0.65% p/v, una concentración de sólidos de 11.27% p/v y una temperatura de 117 °C. Este trabajo se toma como base para realizar las combinaciones de pretratamiento alcalino-hidrotérmico e hidrotérmico-alcalino (dos de las tres alternativas a evaluar) con el fin de obtener mejores resultados.

En este orden de ideas, en la literatura también se encontró un trabajo en el que se obtuvo celulosa a partir de la cáscara del fruto de Cacao Nacional (*Theobroma cacao* L.) por medio de hidrólisis térmica para la elaboración de pulpa de papel, implementando un equipo de explosión de vapor. Las mejores condiciones para la elaboración de pulpa de papel fueron determinadas por análisis de alfa celulosa siguiendo la norma TAPPI 203m-58, concluyendo que las condiciones óptimas de hidrólisis son a 155 °C y 12 min para la obtención de un porcentaje de alfa celulosa representativo de 73.26% (Cabezas, 2020).

Por otra parte, en la literatura se encontró que el procesamiento hidrotérmico, incluye una gran cantidad de condiciones operativas, como lo son la temperatura, presión, tiempo de residencia, tamaño de partícula, entre otros. Y, por lo general, se realiza en un rango de 150 - 230°C durante aproximadamente 10 - 50 minutos, y presiones de 4.9 - 20 bares, para lograr modificar la estructura de la celulosa, evitar la producción de inhibidores de celulosa que puedan disminuir la eficiencia de la hidrólisis enzimática posterior y la fracturación de la biomasa (Ruiz et al, 2020).

3. Metodología

En la Figura 1 se muestra la metodología que se llevará a cabo para cumplir con los objetivos planteados.

Figura 1.*Diagrama de la metodología*

Se utilizó cacao CCN51 siendo el proveedor el Centro de Atención al Sector Agropecuario SENA sede Aguascalientes, el Playón, Santander. Este tipo de variedad de cáscara es utilizado principalmente debido a que es uno de los más cultivados en el país.

3.1. Caracterización de la cáscara de cacao

3.1.1. Secado

Con el fin de reducir el contenido de humedad presente (83.92%) en las cáscaras y obtener un porcentaje por debajo de 10% p/p, se empleó un método denominado secado al aire libre. Este

método se realizó en un invernadero (Figura 2) por aproximadamente 5 días, con una variación de temperatura de 20°C a 26°C (temperatura ambiente) obteniendo una muestra con humedad del 3%.

Figura 2

Secado cáscara de cacao en marquesina



3.1.2. Cuantificación de cenizas y extractivos

Se realizó la disminución de tamaño de la muestra seca siguiendo el protocolo NREL / TP-510-42620 (A. Sluiter et al., 2008) con el objetivo de obtener un material homogéneo con tamaño de partícula inferior a 2 mm, mediante el uso de un molino de cuchillas Fritsch Pulverisette 11. Luego se llevó a cabo un proceso de tamizado empleando tamices de malla número 20 y 80, para obtener la muestra con un tamaño de partícula entre 0.84mm y 0.177mm. Una vez terminado el proceso de disminución de tamaño de partícula, molienda y tamizado, se cuantificó el contenido de cenizas totales en un horno mufla IND Terrigeno D8 empleando una rampa de calentamiento según la norma AOAC 972.15. Posteriormente, se determinó el contenido de extractos orgánicos y acuosos empleando una extracción Soxhlet con etanol de alta pureza (>90%) durante 6 h, seguido

de una extracción Soxhlet con agua destilada durante 16 h, haciendo uso de un sistema de extracción Buchi B-811 siguiendo el protocolo NREL / TP-510-42619 (A. Sluiter et al., 2008).

3.1.3. Cuantificación de lignina y carbohidratos estructurales

La determinación de lignina y carbohidratos estructurales se realizó por medio del protocolo NREL/TP-510-42618 (A. Sluiter et al., 2012). El proceso se inició con una hidrólisis ácida, tomando 300 mg de la muestra libre de extractos, con 3 mL de H₂SO₄ al 72%. Posteriormente esta mezcla se llevó a baño térmico a 30 °C en un equipo de baño María SW22 durante 1h. Una vez pasado el tiempo, se diluyó la mezcla con 84 mL de agua destilada, y se llevó al autoclave presoclave-II 75L a 121 °C por 1h. Finalmente, se obtuvo el hidrolizado, que se filtró al vacío con un papel de filtro Boeco grado 3hw y embudo Buchner.

Posteriormente la muestra que quedó en papel de filtro se usó para la determinación de lignina insoluble. Se inició secando la muestra en una estufa Binder ED 115 a 105°C hasta masa constante, se dejó enfriar en el desecador, y posteriormente fue llevada al horno mufla IND Terrigeno D8 a 575 °C durante 24 h, se dejó enfriar nuevamente en el desecador y finalmente fue pesada la ceniza.

En cuanto al licor del hidrolizado se dividió en dos recipientes, uno para la cuantificación de lignina soluble y el otro para cuantificación de carbohidratos estructurales. Para la lignina soluble en ácido, con el hidrolizado obtenido se procedió a leer la absorbancia a una longitud de onda de 205 nm usando un espectrofotómetro GENESYS UV-Vis (Thermo Scientific, USA), utilizando como blanco H₂SO₄ al 4%.

Para la cuantificación de carbohidratos estructurales, el hidrolizado obtenido se neutralizó con carbonato de calcio, y posteriormente se pasó a través de un filtro de 0.2 µm en un vial de

inyector automático. Las muestras se analizaron por HPLC en el Centro Agroturístico de San Gil, donde se utilizó el método de la ISO 10504:2013. Se inyectaron 10 μ L al cromatógrafo líquido Agilent 1260 Infinity II que empleó un detector de índice de refracción, en una columna Hi-Plex Ca (Duo) de 300 x 6.5 mm, usando como fase móvil agua tipo I a un flujo de 0.200 mL min⁻¹, por un tiempo de corrida de 45 minutos. La temperatura de la columna y el detector fue de 54 °C. Para la cuantificación, se emplearon los estándares externos de sacarosa, glucosa y fructosa (Sigma). La identificación se realizó por tiempo de retención (sacarosa 16.03 min, glucosa 23.94 min, y fructuosa 32.30 min). Las fórmulas para los cálculos realizados se encuentran en Apéndice A y los resultados obtenidos con respecto a otros autores en Apéndice B.

3.2. Combinación de pretratamientos

Se evaluaron tres diferentes alternativas de pretratamientos a la cáscara de cacao: un pretratamiento hidrotérmico en el primer caso, en el segundo caso un pretratamiento hidrotérmico seguido de un pretratamiento alcalino, y en el tercer caso un pretratamiento alcalino seguido de un pretratamiento hidrotérmico. Teniendo en cuenta que el pretratamiento hidrotérmico puede ablandar la matriz lignocelulósica generando zonas amorfas en las partes expuestas de la matriz (Gaibor, 2014), por otro lado, el pretratamiento alcalino solubiliza la fracción que corresponde a lignina, la cual es uno de los interferentes determinantes a la hora de acceder a los componentes de carácter estructural de la biomasa en el pretratamiento hidrotérmico (Suárez, 2017). Se evidencia así la importancia de evaluar la interacción entre los dos pretratamientos y como afecta orden de aplicación.

Cada uno de los pretratamientos se realizaron con condiciones fijas, con el objetivo de comparar los resultados de obtención de azúcares y escoger el mejor. Siendo para el hidrotérmico condiciones de 180 °C, 8 min (punto entre el rango de las variables a evaluar), y para el

pretratamiento alcalino una concentración de NaOH de 0.65% p/v, concentración de sólidos de 11.27% p/v y temperatura de 117 °C durante 1 h (Ávila, S., 2020).

Los diferentes pretratamientos se realizaron en termorreductores de acero inoxidable de 23mL en un baño de aceite siliconado molysil utilizando un BUCHI Heating Bath B-490 con el fin de alcanzar las condiciones deseadas de temperatura.

3.3. Cuantificación de azúcares reductores

Para determinar la cantidad de azúcares reductores en los hidrolizados se utilizó el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico o DNS, el cual se inició realizando la curva de calibración usando como solución madre de glucosa en una concentración de 20 g/L, se tomaron de esta solución 10 alícuotas a diferentes volúmenes (0.25mL, 0.75mL, 1.25mL, 2mL, 2.5mL, 3.25mL, 3.75mL, y 4.5mL). y se completó 50 mL con agua destilada. Después, se diluyó cada una en un factor de 10. Posteriormente, se agregó el DNS (1mL) y agua destilada (10mL), y la solución fue llevada a un baño de agua a 95°C durante 5 minutos, virando a un color anaranjado claro, rápidamente fue llevada a otro baño de agua a 5°C durante un minuto, quedando listas para medir la absorbancia en el espectrofotómetro. Una vez, tomadas las absorbancias de las muestras, se realizó la curva patrón de glucosa (Absorbancia vs Concentración) (Apéndice C).

Dando como resultado la siguiente ecuación de la curva de calibración:

$$Absorbancia = 0.5696 (C_{azúcares}) - 0.0544 \quad (Ec. 1)$$

Ecuación con la cual se cuantificó la concentración de azúcares reductores de los hidrolizados, y se seleccionó la mejor alternativa de las combinaciones de pretratamiento.

3.4. Pretratamiento hidrotérmico

Una vez conocida la alternativa de pretratamiento que permite obtener la mayor concentración de azúcares reductores en el hidrolizado, se procedió a realizar el diseño de experimentos con el fin de optimizar las condiciones del pretratamiento hidrotérmico.

3.4.1. Diseño de experimentos

Se realizó un diseño de experimentos del tipo central compuesto no factorial con 2 puntos centrales y 4 puntos axiales (Tabla 1), teniendo como variables de entrada la temperatura y el tiempo; correspondiente a 18 experimentos realizados por duplicado con el objetivo de obtener las mejores condiciones que favorezcan el fraccionamiento de los compuestos estructurales de la cáscara de cacao.

Tabla 1

Diseño experimental pretratamiento hidrotérmico

Variables	Niveles		Puntos axiales		Punto central
Tiempo [min]	5	10	3.96	11.04	7.5
Temperatura [°C]	165	185	160.86	189.14	175

Para los pretratamientos fue necesario utilizar cáscara de cacao con una humedad <10% p/p, y un tamaño de partícula inferior a 2 mm, para facilitar la preparación de la muestra y el proceso.

Para el pretratamiento seleccionado (alcalino-hidrotérmico) se utilizó un baño de aceite con el objetivo de alcanzar las temperaturas deseadas. Una vez pasado el tiempo de reacción para el pretratamiento alcalino, se pasó por un baño de agua fría con el propósito de detener las

reacciones. La mezcla resultante fue filtrada y separada por un filtrador al vacío, donde la parte líquida fue almacenada para posterior cuantificación de azúcares reductores con el método de DNS (Sección 3.3. Cuantificación de azúcares reductores), y la parte sólida lavada y secada a 40 °C, con el fin de aplicarle el pretratamiento hidrotérmico. A este pretratamiento se le aplicaron las condiciones del diseño de experimentos y posterior al tiempo de reacción se sometió a un baño de agua fría, luego fue filtrada al vacío obteniendo la parte líquida para cuantificación de azúcares al igual que el pretratamiento antes aplicado.

Todos los resultados obtenidos experimentalmente se analizaron con el Software estadístico Statistica (TIBCO, Versión 13.5.0.17).

3.4.2. Análisis estadístico

A partir del software Statistica se estimaron los efectos lineales, cuadráticos e interacciones entre las variables estudiadas, siendo la variable de respuesta (variable dependiente), la concentración de azúcares reductores, y las variables independientes, el tiempo y la temperatura. Para este análisis se tomó un nivel de significancia de 5%.

Se realizó el ANOVA para conocer la significancia de las variables independientes respecto a la variable de respuesta, además de validar el modelo matemático y encontrar el mejor ajuste de este utilizando los parámetros, coeficiente de determinación y el coeficiente de determinación ajustado. El modelo de diseño de segundo orden, específicamente central compuesto (Gutiérrez y De la Vara, 2012) teniendo en cuenta todas las variables e interacciones sigue la siguiente taxonomía:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde, b_0 es el coeficiente constante, $\beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$ son los coeficientes de interacción, lineales y cuadráticos, x_i, x_j son las variables del proceso, y es la variable de respuesta, k es el número de

variables independientes y ε es el error asociado al proceso. Este modelo de segundo orden se utilizó con el fin de conocer la superficie de respuesta, y así optimizar las condiciones de la alternativa de pretratamiento seleccionada anteriormente.

3.4.3. Optimización pretratamiento hidrotérmico

Una vez establecido el modelo del proceso, se determinó el punto óptimo de las condiciones para el diseño realizado. Para esto se empleó el método de la función de deseabilidad, que consiste en la conversión de los valores de la variable de respuesta a valores de deseabilidad, los cuales varían de 0 a 1, es decir, un valor cercano a 1 es un valor deseado y un valor cercano a 0 es indeseado. Para graficar los perfiles de deseabilidad, se graficó una variable independiente manteniendo la otra variable fija, con el fin de conocer el valor en que la variable optimiza el proceso dando como respuesta la mayor cantidad de azúcares reductores (valor deseado). La función está dada por:

$$d_1(x) = \begin{cases} \left[\frac{C_{azc}(x)-L}{H-L} \right] & \text{si } L < C_{azc}(x) < H \\ 1 & \text{si } C_{azc}(x) \geq H \\ 0 & \text{si } C_{azc}(x) \leq L \end{cases} \quad (Ec. 3)$$

Siendo $C_{azc}(x)$ el valor estimado de la variable de respuesta, L y H el valor mínimo y máximo aceptado de concentración de azúcares reductores respectivamente (Gutiérrez y De la Vara, 2012) según las concentraciones resultantes del diseño de experimentos.

4. Resultados

4.1. Resultados caracterización

De la caracterización fisicoquímica realizada a la cáscara de cacao (*Theobroma cacao L.*) se obtuvo que la cáscara de cacao fresca cuenta con una humedad en promedio de 83.92% p/p, y una vez realizado el proceso de secado, molienda y tamizado se obtuvo que la humedad de la

cáscara se redujo al 6.15% p/p, cumpliendo con el requisito de humedad menor al 10% p/p. En cuanto al contenido de ceniza se obtuvo un porcentaje de 10.66% p/p. Por otra parte, los extractivos corresponden al 39.35% de la cáscara de cacao, la lignina total a un 22.31% p/p y la celulosa a un 14.14% p/p.

Por lo anterior, debido a que se cuenta con un alto porcentaje de contenido de lignina y según la información encontrada en la literatura sobre estudios anteriormente realizados de este tipo de cacao (Ávila y Díaz, 2020), se hace necesario aplicar un pretratamiento para liberar los azúcares reductores. Con el fin de aprovechar los diversos azúcares poliméricos, como son la glucosa (celulosa) y xilosa (hemicelulosa), que se pueden transformar por vía química o biotecnológica en productos de gran valor como azúcares, etanol, distintos productos químicos y enzimas (Muñoz y Riera, 2021).

4.2. Resultados de la combinación de pretratamientos

La elección del mejor pretratamiento se toma a partir de los azúcares reductores resultantes del hidrolizado. Para esto, se realizó la metodología DNS (Sección 3.3 y Apéndice C), donde dio como resultado que la alternativa de pretratamiento alcalino-hidrotérmico es la más apta, liberando una mayor cantidad de azúcares reductores, una concentración aproximada de 25.97 g/L (0.56 g azúcares reductores/g cáscara seca) en comparación a la concentración de 10.66 g/L (0.23 g azúcares reductores/g cáscara seca) obtenido del pretratamiento hidrotérmico y una concentración de 23.75 g/L (0.51 g azúcares reductores/g cáscara seca) para el pretratamiento hidrotérmico-alcalino.

Dando como resultado que los dos pretratamientos se complementan mejor en el caso de la mejor alternativa (alcalino-hidrotérmico), donde se inicia con el pretratamiento alcalino, el cual

ayuda a acceder con mayor facilidad a la celulosa y a la hemicelulosa, debido a que provoca que se disminuya la cristalinidad de la biomasa, obteniendo así ruptura entre las uniones estructurales de la lignina y los carbohidratos. Posteriormente, se realiza el pretratamiento hidrotérmico que solubiliza principalmente la hemicelulosa para que la celulosa sea más accesible, y evita la formación de inhibidores (Pérez, 2016).

4.3. Resultados pretratamiento alcalino-hidrotérmico

Por medio del software Statistica se determinaron las condiciones en las que se debía evaluar el pretratamiento hidrotérmico (pretratamiento que se quiere optimizar) en la alternativa seleccionada (alcalino-hidrotérmico), es decir, una vez aplicadas las condiciones óptimas del pretratamiento alcalino determinadas según (Ávila y Díaz, 2020) en la muestra (117 °C, 1 hora, concentración de sólidos de 11.27%p/v, en NaOH con una concentración de 0.65%p/v), dando como resultado los datos plasmados en la Tabla 2, donde se puede observar que para 185°C y 5min se obtuvo la mayor cantidad de concentración de azúcares en g/L.

Tabla 2

Resultados del diseño experimental, pretratamiento hidrotérmico

Tiempo [min]	Temperatura [°C]	Conc. Azúcares [g/L]
5.00	165.00	23.39 ± 0.48
5.00	185.00	26.01 ± 0.70
10.00	165.00	22.25 ± 0.11
10.00	185.00	23.43 ± 0.19
3.96	175.00	22.76 ± 0.02
11.04	175.00	21.37 ± 0.49
7.50	160.86	22.77 ± 0.42

7.50	189.14	24.32 ± 0.85
7.50	175.00	21.40 ± 0.18

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos de la estimación de los efectos de cada una de las variables y su interacción.

Tabla 3

Efectos estimados, ANOVA

Factor	Efecto	Valor-p
<i>Lineal</i>		
Tiempo (L)	-1,42474	0,002184
Temperatura (L)	1,49836	0,005733
<i>Cuadrático</i>		
Tiempo (Q)	1,14209	0,001884
Temperatura (Q)	2,62966	0,000497
<i>Interacción</i>		
Tiempo by Temperatura	-0,72178	0,038072

Los resultados obtenidos de la estimación indican que todas variables independientes tienen efecto significativo sobre la variable de respuesta. Esta estimación se realizó con un intervalo de confianza del 95%, y se encontraron los siguientes efectos significativos: dos efectos lineales, dos cuadráticos y la interacción entre las dos variables independientes. Por lo tanto, la ecuación modelo esta expresada por:

$$CA = 399.29 + 0.87t - 4.42T + 0.09t^2 + 0.01T^2 - 0.01 * t * T \quad (Ec. 4)$$

En la Tabla 4, se encuentran los parámetros de ajuste del modelo de regresión.

Tabla 4

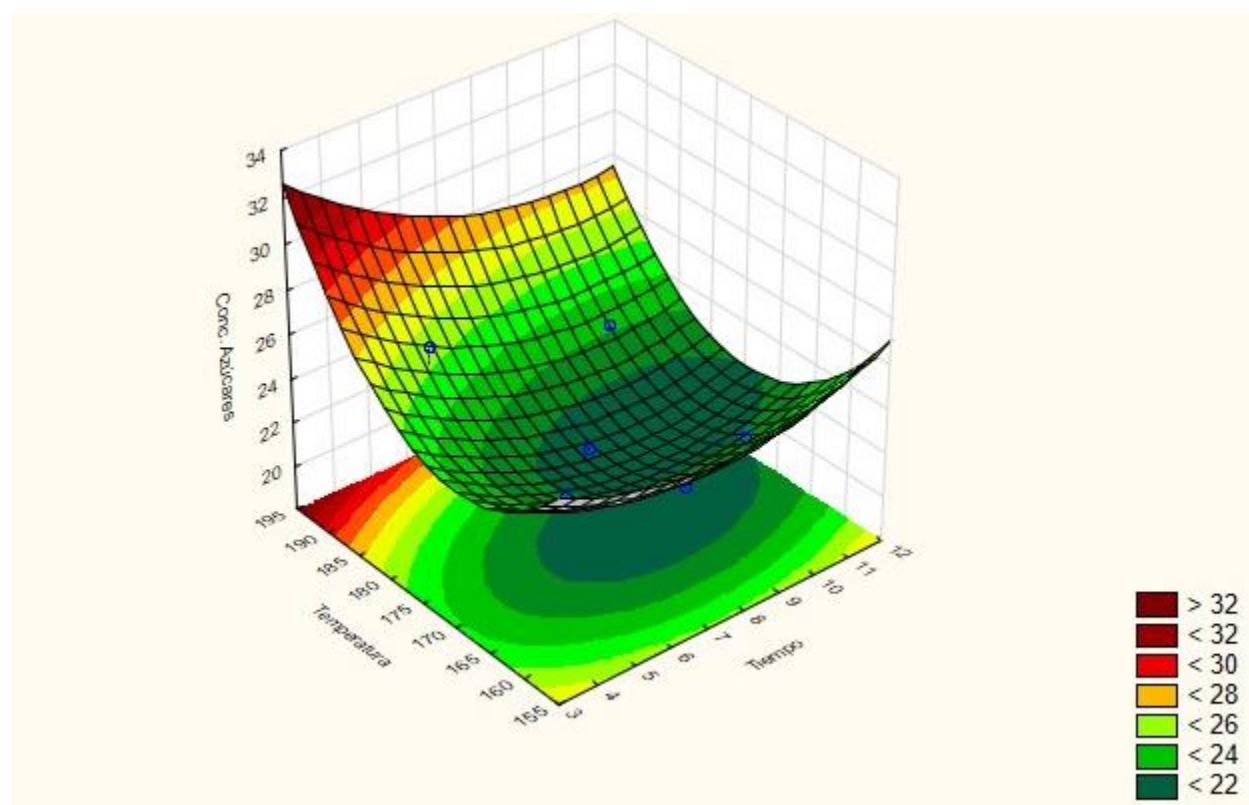
Parámetros de ajuste del modelo de regresión

Parámetro	Valor
Valor P de la falta de ajuste	0.017
R^2	0.885
R^2_{adj}	0.789

Con la Ec. 4 se determinó la superficie de respuesta (Figura 3) del diseño de experimentos, donde se puede observar la curvatura, permitiendo conocer cómo afecta el tiempo y la temperatura en la concentración de azúcares reductores, además de los niveles de las variables que optimizan el pretratamiento escogido.

Figura 3.

Superficie de respuesta



En la figura 3 se puede observar que al aumentar la temperatura afecta positivamente a la concentración de azúcares reductores, sin embargo, por el contrario, el tiempo al aumentar su valor afecta negativamente a la variable de respuesta, dando una menor concentración. En cuanto, a la curvatura presente en la superficie de respuesta se puede deducir que la temperatura tiene mayor influencia en la variable de respuesta, ya que al disminuirla afecta significativamente a pesar de que el tiempo sea mayor o menor.

No obstante, esto aplica para el rango de temperatura evaluado, ya que generalmente estos procesos son realizados a temperaturas entre 160° y 240°C, debido a que a temperaturas más altas el efecto es negativo, puesto que generalmente cuando la biomasa se expone a estas temperaturas se liberan inhibidores y ácidos, subproductos que pueden interferir con el correcto proceso de hidrólisis (Cheah et al, 2020). A una temperatura mayor de 240 °C provocará una degradación severa de la celulosa, disminuyendo el porcentaje de composición de celulosa que reducirá el rendimiento total de glucosa (Rizal et al, 2018).

Sin embargo, la interacción entre las dos variables independientes, da como resultado un efecto negativo, debido a que a mayor tiempo de residencia no libera la mayor cantidad de azúcares reductores, haciendo indispensable aplicar altas temperaturas y un menor tiempo de residencia, o por el contrario temperaturas bajas y un mayor tiempo de residencia. Esto se debe a la formación de sustancias inhibidoras del proceso como lo son los compuestos heterocíclicos y fenólicos (vainillina, alcohol vainillínico, furfural y HMF) (Hendriks & Zeeman, 2009; Jeong & Lee, 2015). Así mismo, se evidencia en la literatura ya que la temperatura y el tiempo no son proporcionales según (Cabezas, 2019), estudio sobre “la obtención de celulosa a partir de la cáscara de cacao ecuatoriano (*Theobroma cacao* L.) mediante hidrólisis térmica para la elaboración de pulpa de

papel”, cuyos rangos de temperatura ideales fueron 175°C, 155°C y 135°C en tiempos de residencia de 4,8 y 12min.

Las ventajas del proceso hidrotérmico comparado con otros procesos químicos son la prevención de la corrosión en equipos utilizados, ya que solo se usa agua en el tratamiento, además no requiere de un químico como catalizador (Joelsson et al., 2016), o para tratamientos de neutralización y purificación de los productos lo que lo convierte en un proceso amigable con el medio ambiente (Teschke & Demers, 2001).

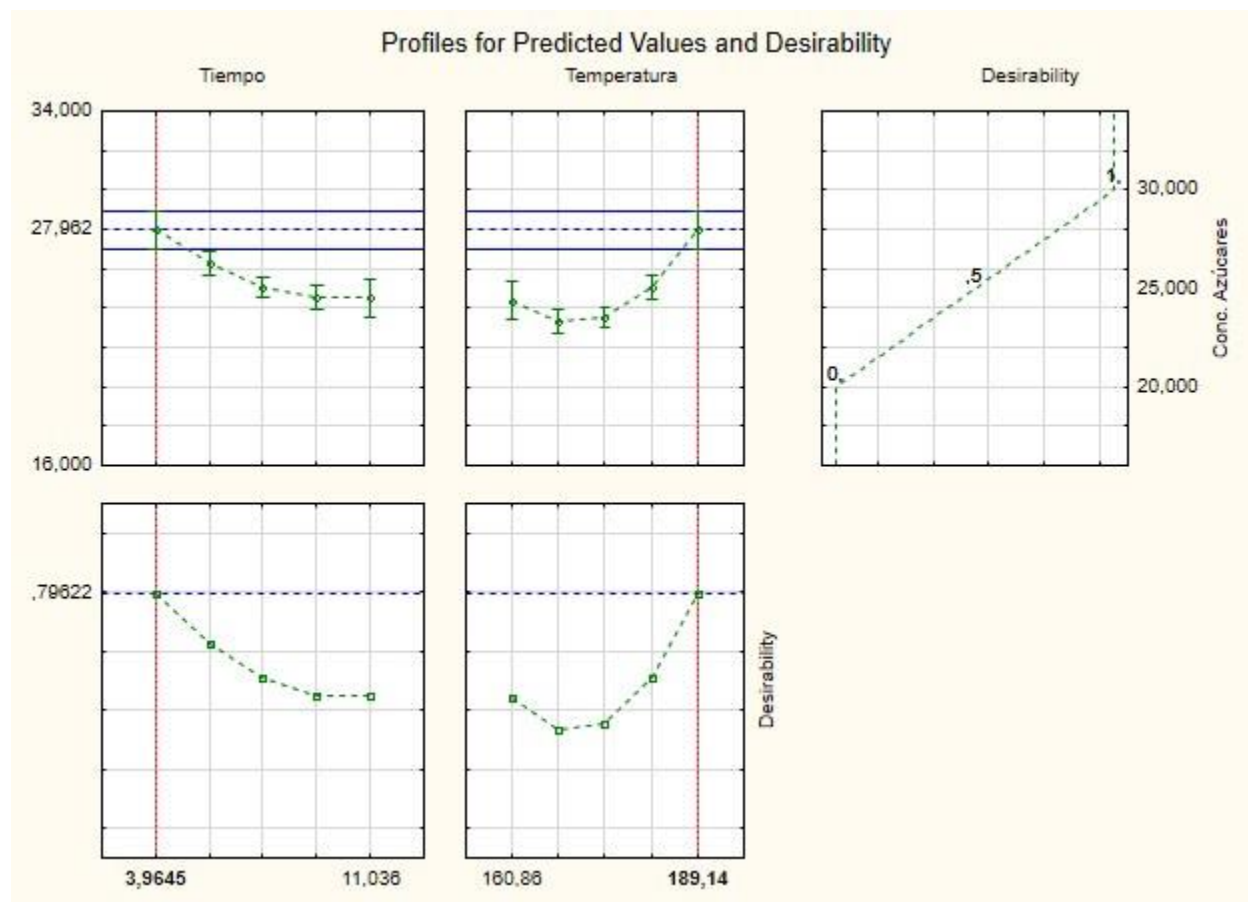
En la figura 4 se encuentran los perfiles de deseabilidad, donde se puede observar el comportamiento de cada una de las variables por separado, sobre la variable de respuesta. La gráfica del tiempo indica que a medida que aumenta el tiempo, la concentración de azúcares reductores obtenidos disminuye, reflejándose en su valor de deseabilidad, caso contrario al comportamiento de la temperatura.

Las condiciones favorables obtenidas del diseño de experimentos fueron un tiempo de 3.96 minutos y una temperatura de 189.14 °C correspondiente a una concentración de 27.96 g/L (0.61 g azúcares reductores/g cáscara seca), para un valor de deseabilidad del 0.796, siendo 30g/L (0.65 g azúcares reductores/g cáscara seca) el valor deseado y 20 g/L (0.43 g azúcares reductores/g cáscara seca) valor indeseado (Durán y Salcedo, 2020; Cabrera y Novoa, 2016). Esto confirmando los resultados analizados en las superficies de respuesta. Este valor obtenido de azúcares reductores influye en su posterior uso en la formulación de medios de cultivo para fermentaciones bacterianas, esto según (Guevara et al, 2019) estudio sobre “La influencia de la concentración de Azúcares Reductores Totales “ART” de “brácteas” de *Cynara scolymus* L. var. *lorca* (Asteraceae) “alcachofa” en la producción de biomasa de *Candida utilis* var. *major* CECT 1430” donde se

concluye que la producción de biomasa aumenta progresivamente tal como se incrementa las concentraciones de azúcares reductores.

Figura 4.

Perfiles de deseabilidad



5. Conclusiones

- La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) de variedad CCN51 utilizada en el proyecto cuenta con una composición porcentual de 39.35% de extractivos, 22.31% de lignina, 14.14% de celulosa, y 10.66% de ceniza.

- La mejor alternativa de pretratamiento es el pretratamiento alcalino-hidrotérmico, el cual obtuvo una mayor cantidad de azúcares reductores en el hidrolizado de 25.97 g/L en comparación a la concentración de 23,75 g/L para el pretratamiento hidrotérmico-alcalino y una concentración de 10.66 g/L del pretratamiento hidrotérmico.
- Se confirmó que el tiempo y la temperatura, tuvieron influencia en la variable de respuesta (concentración de azúcares reductores), además de que la interacción entre el tiempo y la temperatura también tiene significancia.
- Las condiciones óptimas del pretratamiento hidrotérmico son temperatura de 189.14 °C y tiempo de 3.96 minutos, correspondiente a una concentración de azúcares reductores del 27.96 g/L.

6. Recomendaciones

Cuantificar el contenido de los monómeros que componen el hidrolizado liberados durante la mejor alternativa de pretratamiento (alcalino-hidrotérmico) con el fin de conocer la influencia de las variables independientes sobre cada uno de estos.

Cuantificar el contenido de celulosa y hemicelulosa presentes en la parte sólida resultante del pretratamiento con el fin de conocer la influencia de las variables independientes sobre cada una de estas.

Cuantificar el contenido de posibles inhibidores (ácido acético, furfural e hidroximetil-furfural) en los hidrolizados resultantes de los pretratamientos.

Referencias bibliográficas

- Ángel. M., Sánchez. A., González. D., Steven. L., Arce. M., Delgado López. T., & Montoya Rodríguez. P. (2017). Manual técnico del cultivo de cacao: prácticas latinoamericanas. IICA.
- Anwar. Z., Gulfraz. M., & Irshad. M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 7(2). 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.02.003>
- Arango. R. (2021). Determinación de azúcares reductores totales utilizando el método dns por espectrofotometría UV-VIS. Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA).
- Ávila. S., & Díaz. F. (2020). Estudio de las condiciones del pretratamiento alcalino e hidrólisis enzimática de cáscara de cacao (*Theobroma cacao L.*) de tipo CCN51 en la producción de azúcares fermentables. Universidad Industrial de Santander.
- A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, & D. Templeton. (2008). Preparation of Samples for Compositional Analysis. National Renewable Energy Laboratory (NREL).
- A. Sluiter, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, & D. Templeton. (2008). Determination of Extractives in Biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL).
- A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, & D. Crocker. (2012). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL).
- Bell. G., Schuck. S., Jungmeier. G., Wellisch. M., Felby. C., Jorgensen. H., Stichnothe. H., Clancy. M., De Bari. I., & Kimura. S. (2014). Sustainable and synergetic processing of biomass into marketable food & feed ingredients, products (chemicals. materials) and energy (fuels. power heat). IEA BIOENERGY Task42 BIOREFINING.

- Cabezas, M. (2019). Obtención de celulosa a partir de la cáscara de cacao ecuatoriano (*Theobroma cacao* L.) mediante hidrólisis térmica para la elaboración de pulpa de papel. Universidad Central del Ecuador. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/19765>
- Cabrera, C., & Novoa, C. Influencia de la concentración y temperatura de fermentación de azúcares reductores obtenidos a partir de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar, en la obtención de un biopolímero empleando *Bacillus subtilis*. Recuperado de: <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/agroindscience/article/view/1124/1050>
- Cheah W.Y., Sankaran R., Show P.L., Tg. Ibrahim T.N.B., Chew K.W., Culaba A., Chang J-S. Pretreatment methods for lignocellulosic biofuels production: current advances, challenges and future prospects. *BiofuelResearch Journal*. DOI: 10.18331/BRJ2020.7.1.4
- Cruz, G., Pirilä, M., Huuhtanen, M., Carrión, L., Alvarenga, E., & Keiski, R. L. (2012). Production of Activated Carbon from Cocoa (*Theobroma cacao*) Pod Husk. *Journal of Civil & Environmental Engineering*. doi: 10.4172/2165-784X.1000109
- Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales. (2021). Cadena de Cacao.
- Durán, M., & Salcedo, B. Determinación de condiciones de hidrólisis ácida de cáscara de cacao CCN51 para la producción de azúcares fermentables. Universidad Industrial de Santander.
- Gaibor, J. (2014). Diseño de un proceso físico químico para la producción de azúcares reductores a partir del residuo de la extracción del aceite de Piñon (*Jatropha curcas*). Escuela Politécnica Nacional. URI: <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/7156>
- Guevara, G., Mendoza, L., Moreno, Y., Portilla, E. & León, C. (2019). Influencia de la concentración de Azúcares Reductores Totales “ART” de “brácteas” de *Cynara scolymus* L. var. lorca (Asteraceae) “alcachofa” en la producción de biomasa de *Candida utilis* var. major CECT 1430. <http://www.scielo.org.pe/pdf/arnal/v26n3/a10v26n3.pdf>

- Gutiérrez H., & De la Vara, R. (2012). *Análisis y Diseño de Experimentos*. Mc Graw Hill, 370-398. ISBN: 978-607-15-0725-9.
- Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100 (1), 10–18.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>
- Jeong, S.-Y., & Lee, J.-W. (2015). Hydrothermal treatment. In *Pretreatment of biomass processes and technologies*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800080-9.00005-0>
- Joelsson, E., Erdei, B., Galbe, M., Wallberg, O., 2016. Techno-economic evaluation of integrated first-and second-generation ethanol production from grain and straw. *Biotechnol. Biofuels*.
- Kumar. S., Kothari. U., Kong. L., Lee. Y. Y., & Gupta. R. B. (2011). Hydrothermal pretreatment of switchgrass and corn stover for production of ethanol and carbon microspheres. *Biomass and Bioenergy*. 35(2). 956–968. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.11.023>
- Martínez-Ángel. J. D., Villamizar-Gallardo. R. A., & Ortiz-Rodríguez. O. O. (2015). Characterization and evaluation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk as a renewable energy source. *Agrociencia*. Colegio de Postgraduados.
- Muñoz, A., & Riera, M. (2021). Residuos lignocelulósicos como materia prima de segunda generación en procesos de biorrefinación. *Avances en Química*, 16(3), 81-87
- Phillips. W., & Cerda. R. (2011). *Catálogo: Enfermedades del cacao en Centroamérica*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. CATIE. ISBN: 978-9977-57-501-8
- Rivera. H. D. (2018). Obtención de celulosa mediante hidrólisis térmica a partir de biomasa residual procedente del banano (*musa acuminata*. aaa) y de la caña de azúcar (*saccharum officinarum*). Universidad Central del Ecuador.
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/14422/1/T-UCE-0017-0089-2018.pdf>

- Rizal, N., Ibrahim, M., Zakaria, M., Abs-Aziz, S., Yee, P., & Hassan, M. (2018). Pre-treatment of Oil Palm Biomass for Fermentable Sugars Production. *Molecules*, 23(6), 1381. doi:10.3390/molecules23061381
- Rodríguez. I. (2016). Pretratamiento de hidrólisis hidrotérmica para la degradación de los carbohidratos complejos de residuos de frutas para la obtención de bioetanol. Universidad de Oviedo.
- Ruiz. H. A., Conrad. M., Sun. S. N., Sanchez. A., Rocha. G. J.M., Romaní. A., Castro. E., Torres. A., Rodríguez-Jasso. R. M., Andrade. L. P., Smirnova. I., Sun. R. C., & Meyer. A. S. (2020). Engineering aspects of hydrothermal pretreatment: From batch to continuous operation. scale-up and pilot reactor under biorefinery concept. In *Bioresource Technology* (Vol. 299). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122685>
- Sharma, N., Sharma, N., 2017. Microbial xylanases and their industrial applications as well as future perspectives: a review. *Global J. Biol. Agric. Health Sci.* 6, 5-12.
- Suárez, K. (2017). Evaluación de tratamientos alcalinos e hidrotérmicos asistidos con microondas para la obtención de azúcares a partir de tallo de maíz. Universidad Distrital Francisco José de Caldas.
- Teschke, K., & Demers, P. (2001). Industria del papel y de la pasta de papel. En: *Enciclopedia de la Salud y Seguridad en el Trabajo*. Organización Internacional del Trabajo y Asuntos Sociales. Recuperado de <http://public.ebib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=320485>
- Xu, X., Xu, Z., Shi, S., Lin, M., 2017. Lignocellulose degradation patterns, structural changes, and enzyme secretion by *Inonotus obliquus* on straw biomass under submerged fermentation. *Bioresour. Technol.* 241, 415-423.

Apéndices

Apéndice A. Ecuaciones para el cálculo de la composición porcentual

Contenido de extractivos

Con la siguiente fórmula se calcula el porcentaje de extractivos presentes en la muestra:

$$\%Extractivos = \frac{W_1 - W_2}{W_i} \times 100$$

Donde.

W_1 : Masa inicial de la muestra [g]

W_2 : Masa final de la muestra [g]

Contenido de lignina

Una vez realizada la hidrólisis ácida se calcula el contenido de lignina insoluble (%AIL), soluble (%ASL) y total (%Lignina) se determina a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\%AIL = \frac{(W_{pf+m} - W_{pf}) - (W_{pf+c} - W_{pf})}{W_i} \times 100$$

Donde.

W_{pf+m} : Masa de la muestra + papel filtro [g]

W_{pf} : Masa del papel filtro [g]

W_{pf+c} : Masa ceniza + papel filtro [g]

W_i : Masa inicial de la muestra [g]

$$\%ASL = \frac{UV_{abs} \times V_{filtrate} \times D}{\epsilon \times W_i \times Pathlength} \times 100$$

Donde.

UV_{abs} : Absorbancia a 205nm

$V_{filtrate}$: Volumen del filtrado. 86.73mL [L]

D : Factor de dilución

ε : Coeficiente de extinción. 110 [$g * L^{-1} * cm^{-1}$]

W_i : Masa inicial de la muestra [g]

$Pathlength$: Longitud de la trayectoria de la celda UV – Vis [cm]

Una vez hallados los porcentajes de lignina soluble e insoluble, se calcula el porcentaje de lignina total:

$$\%Lignina = \%AIL + \%ASL$$

Contenido de celulosa

Para calcular el porcentaje de celulosa a partir de los datos medidos con HPLC es necesario calcular primero la concentración de los azúcares monoméricos correspondientes, utilizando una corrección anhidro de 0.90 (ó 162/180) correspondiente para los Azúcares C-6 (glucosa, galactosa y manosa).

$$\%Celulosa = \frac{(C_{gluc} * 0.90) * V * \frac{1g}{1000mg}}{W_i} * 100$$

Donde.

C_{gluc} : Concentración de glucosa [$mg * mL^{-1}$]

V : Volumen del filtrado. 86.73mL [L]

W_i : Masa inicial de la muestra [g]

Apéndice B. Tabla caracterización fisicoquímica de la cáscara de cacao

Se realizó una tabla de comparación con respecto a las composiciones de la cáscara de cacao CCN51 reportadas en la literatura.

Tabla B1

Composición cáscara de cacao

Referencia	Variedad	Lugar de origen	Método de caracterización	composición (%p/p)				
				Extractivos	Lignina	Celulosa	Hemicelulosa	Cenizas
Autores	CCN51	Santander	Protocolos NREL	39.35	22.31	14.14	-	10.06
(Ávila. F et al. 2020)	CCN51	Santander	Protocolos NREL	38.84	22.63	15.3	7.16	6.38
(Durán. M et al. 2020)	CCN51	Santander	Métodos AOAC	-	-		78.27	9.09
(Tapia, C., 2015)	CCN51	Santander	Protocolos AOAC	31.8-61.4	-	-	-	6.0-10.8

Apéndice C. Método del DNS

Se hizo uso del método del ácido dinitrosalicílico (DNS) con el fin de cuantificar los azúcares fermentables en la cáscara de cacao (Arango. 2021). Para lo anterior, es necesario realizar una curva de calibración con el fin de obtener la concentración de glucosa en cada muestra, para ello se parte de la siguiente ecuación, la cual relaciona el volumen de la solución de glucosa. el volumen final y la concentración de la solución madre.

$$C_{Glucosa} = \frac{V_{Solución\ glucosa} \cdot C_{Solución\ madre}}{V_{final}}$$

La solución madre se preparó con una concentración de 20 g/L. Para preparar dicha solución fue necesario utilizar un vaso de precipitado (peso: 34.3612g) para pesar en la balanza analítica 2.0045 g de glucosa. Se le agregó agua destilada al vaso de precipitado y se agitó para obtener una mezcla

homogénea con ayuda de una varilla de agitación, después de ello se vertió en un balón aforado, y se diluyó con agua destilada hasta completar un volumen de 100 mL.

Luego de preparar la solución madre, se tomaron 10 alícuotas a diferentes volúmenes (0.25mL, 0.75mL, 1.25mL, 2mL, 2.5mL, 3.25mL, 3.75mL, y 4.5mL), se vertieron cada una en un balón aforado diferente y se agregó la cantidad de agua destilada necesaria para completar un volumen de 50 mL. Después de esto, con el fin de diluir se tomó 1 mL de cada una de las soluciones preparadas y se agregó junto con 9 mL de agua destilada a un tubo de ensayo.

Finalmente, se tomó 1 mL de la solución diluida y se le agregaron 1 mL de DNS y 10 mL de agua destilada. Dicha solución fue llevada a un baño de agua a 95°C durante 5 minutos, virando a un color anaranjado claro. rápidamente fue llevada a otro baño de agua a 5°C durante un minuto. quedando listas para medir la absorbancia en el espectrofotómetro. Una vez, tomadas las absorbancias de las muestras y calculadas las concentraciones con la ecuación descrita, se hace la curva patrón de glucosa (Absorbancia vs Concentración).

De la gráfica obtenida. se puede observar que la concentración de la glucosa depende de forma lineal de la cantidad de luz absorbida por dicha muestra. y se rige por la siguiente ecuación:

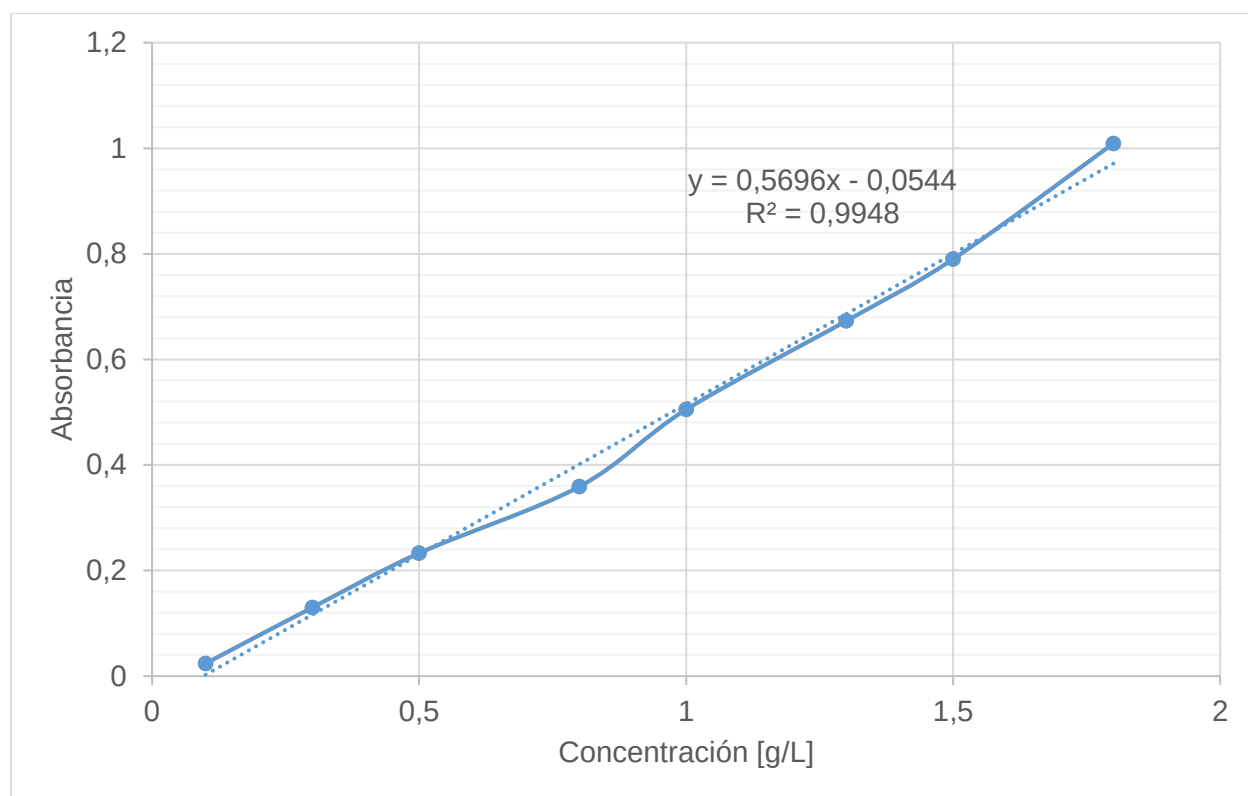
$$\text{Absorbancia} = 0.5696 (C_{\text{Glucosa}}) - 0.0544$$

Se puede observar un comportamiento directamente proporcional de la cantidad de luz absorbida por la muestra respecto a la concentración de glucosa. Así pues, con la curva de calibración, se procede a medir la absorbancia en el espectrofotómetro y concentración de las muestras a analizar

provenientes de la cáscara una vez realizado el protocolo de la cuantificación de lignina y carbohidratos estructurales, siendo leídas las absorbancias del hidrolizado (una vez neutralizado) a una longitud de onda de 540nm. Es importante mencionar que estas muestras también pasaron por un proceso de dilución y de adición de DNS al igual que las alícuotas que se usaron para hacer la curva de calibración.

Figura C1

Curva de calibración del método DNS



Apéndice D. Curvas de calibración HPLC

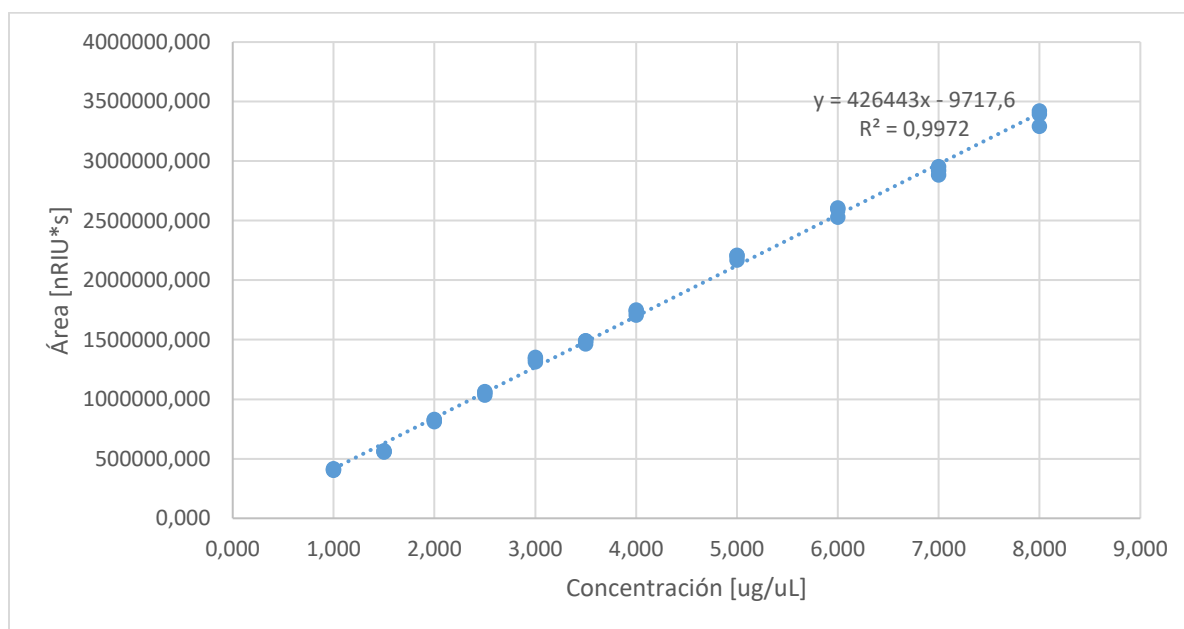
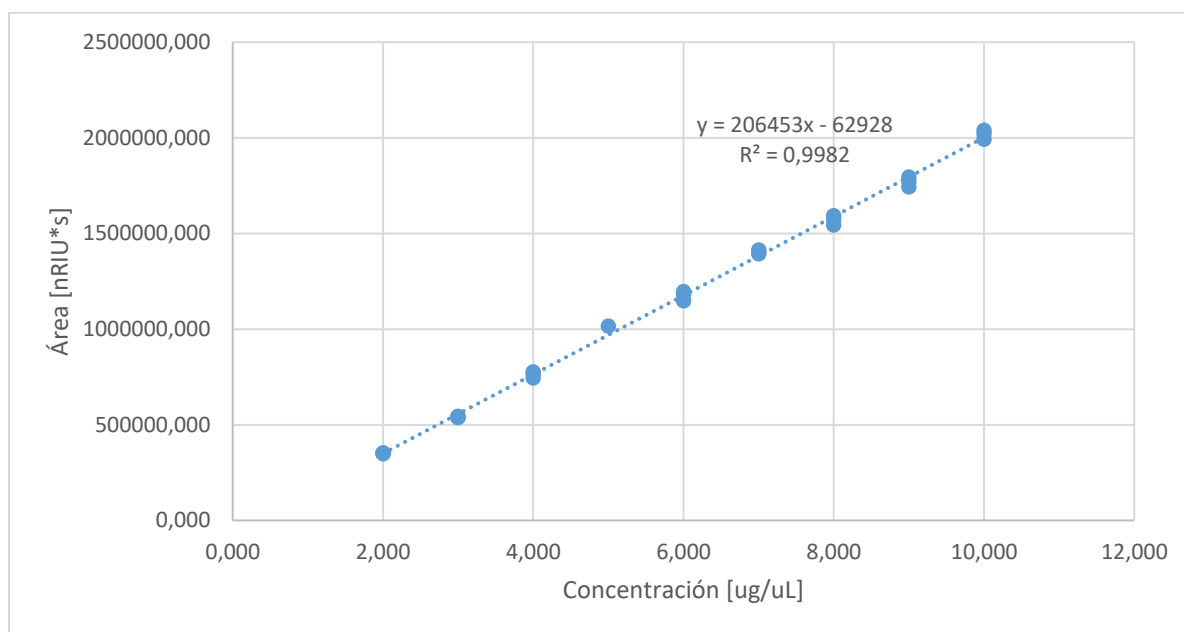
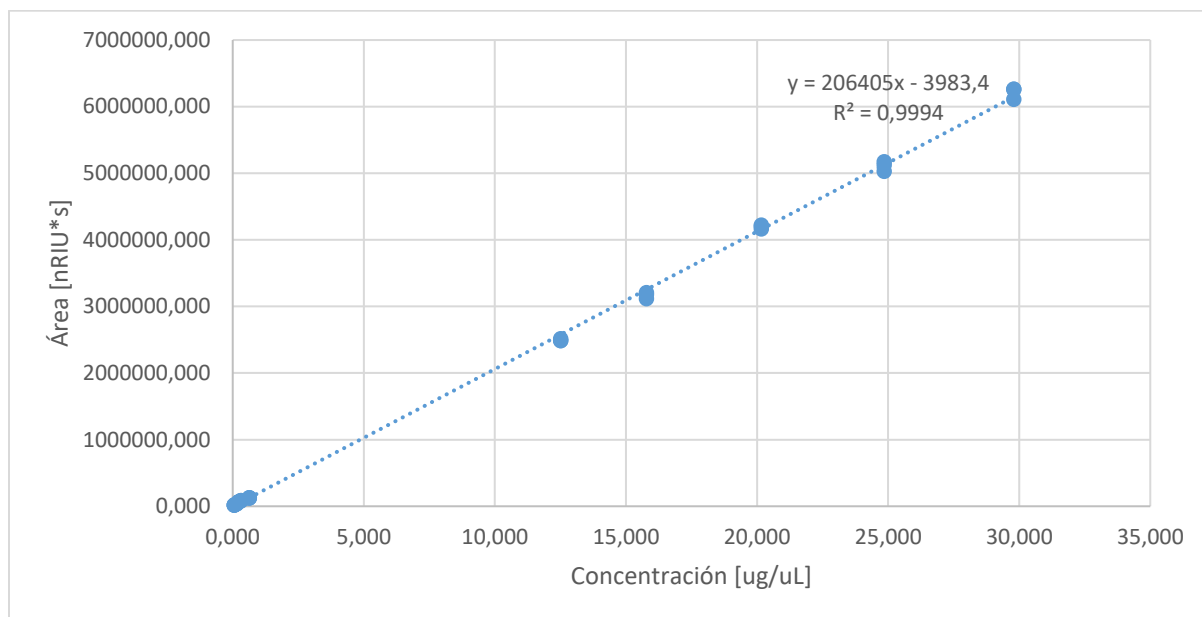
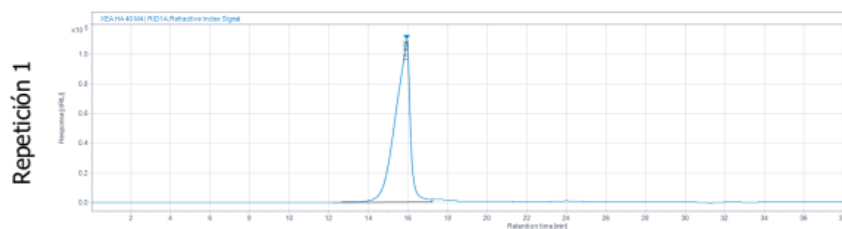
Figura D1*Curva de calibración de glucosa***Figura D2***Curva de calibración de fructuosa*

Figura D3

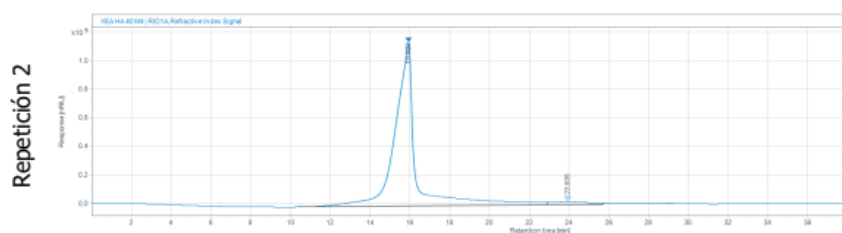
Curva de calibración de sacarosa

**Apéndice E. Cromatograma HPLC caracterización****Figura E1**

Cromatograma del sólido sin pretratamiento



# S	Name	Signal description	RT (min)	Area (nRIU·s)	Area %	Height (nRIU)	Height %
1	N. I.	RID1A,Refractive Index Signal	15,926	5701376,186	100,000	109099,224	100,00

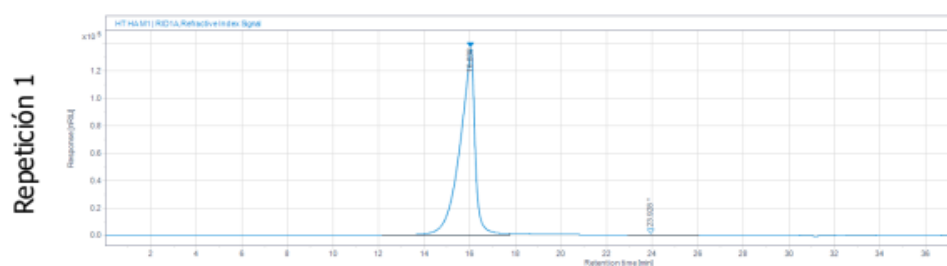


# S	Name	Signal description	RT (min)	Area (nRIU·s)	Area %	Height (nRIU)	Height %
1	N. I.	RID1A,Refractive Index Signal	15,923	8150643,818	97,345	113935,464	98,50
2	Glucosa	RID1A,Refractive Index Signal	23,935	222312,809	2,655	1731,419	1,50

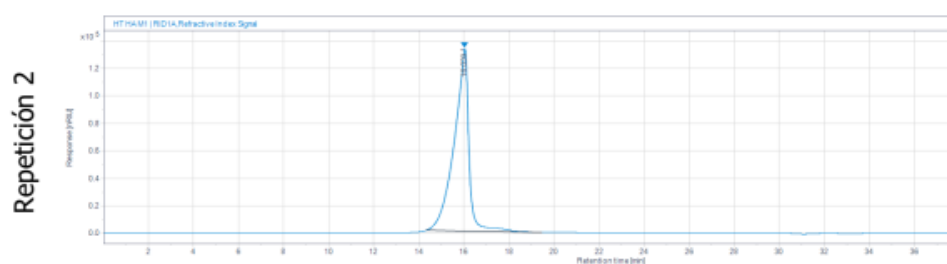
Apéndice F. Cromatograma HPLC del hidrolizado del sólido resultante de las alternativas de pretratamiento

Figura F1

Cromatograma de la parte sólida resultante del pretratamiento hidrotérmico



# S	Name	Signal description	RT (min)	Area (nRIU·s)	Area %	Height (nRIU)	Height %
1	N. I.	RID1A,Refractive Index Signal	16,038	6303430,845	99,776	136162,030	99,86
2	Glucosa	RID1A,Refractive Index Signal	23,928	14173,362	0,224	195,429	0,14



# S	Name	Signal description	RT (min)	Area (nRIU·s)	Area %	Height (nRIU)	Height %
1	N. I.	RID1A,Refractive Index Signal	16,039	6031044,921	100,000	132824,746	100,00

Figura F2

Cromatograma de la parte sólida resultante del pretratamiento hidrotérmico-alcalino

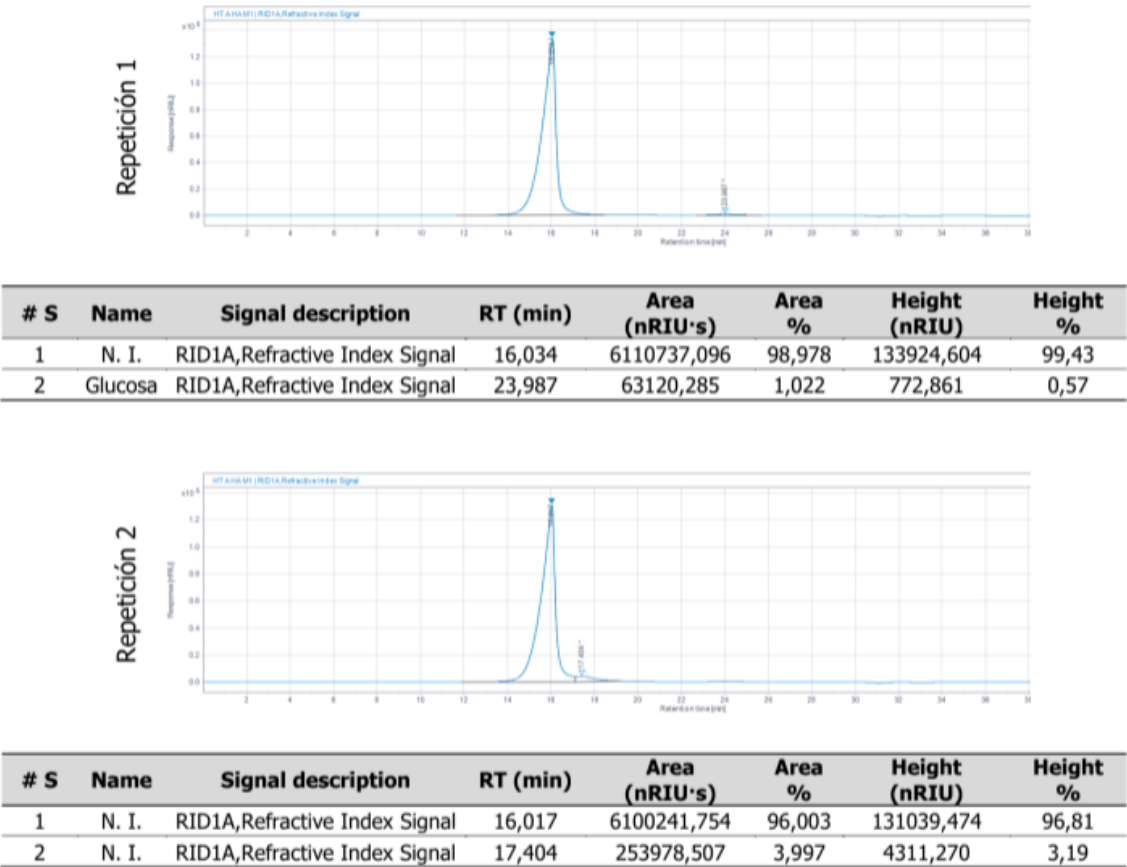
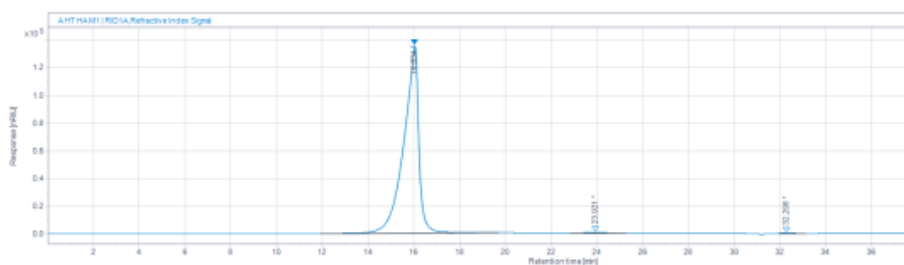


Figura F3

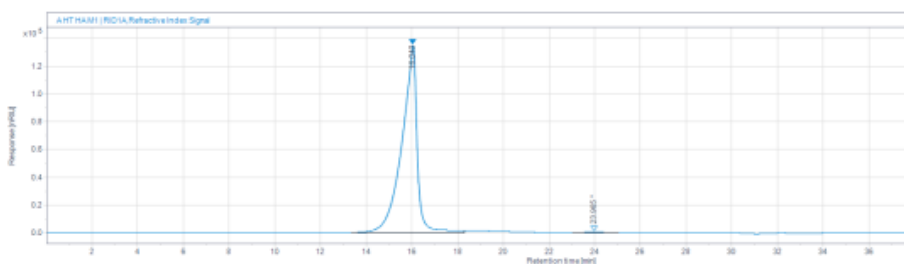
Cromatograma de la parte sólida resultante del pretratamiento alcalino-hidrotérmico

Repetición 1



# S	Name	Signal description	RT (min)	Area (nRIU·s)	Area %	Height (nRIU)	Height %
1	N. I.	RID1A,Refractive Index Signal	16,034	6201011,970	99,468	135153,110	99,66
2	Glucosa	RID1A,Refractive Index Signal	23,921	29120,629	0,467	377,064	0,28
1	Fructosa	RID1A,Refractive Index Signal	32,298	4029,443	0,065	87,160	0,06

Repetición 2



# S	Name	Signal description	RT (min)	Area (nRIU·s)	Area %	Height (nRIU)	Height %
1	N. I.	RID1A,Refractive Index Signal	16,040	6275843,994	99,622	134530,984	99,75
2	Glucosa	RID1A,Refractive Index Signal	23,965	23811,907	0,378	334,792	0,25

