

**EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DEL PRETRATAMIENTO DE BAGAZO DE  
CAÑA DE AZÚCAR CON ÁCIDO FOSFÓRICO SEGUIDO DE  
DESLIGNIFICACIÓN CON HIDRÓXIDO DE SODIO**

**PAULA CATALINA HOYOS VÁSQUEZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2012**

**EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DEL PRETRATAMIENTO DE BAGAZO DE  
CAÑA DE AZÚCAR CON ÁCIDO FOSFÓRICO SEGUIDO DE  
DESLIGNIFICACIÓN CON HIDRÓXIDO DE SODIO**

**PAULA CATALINA HOYOS VÁSQUEZ**

Trabajo de grado para optar por el título de  
**INGENIERO(A) QUÍMICA**

Directora: **Aline Carvalho da Costa**

Ingeniera Química, Msc. PhD

Codirectora: **Maria Paola Maradei Garcia**

Ingeniera Química, Msc. PhD

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2012**

## DEDICATORIA

*A Dios que me acompaña en cada paso de mi vida.*

*A mis padres, hermanos y sobrinos por su amor, comprensión, dedicación y apoyo incondicional.*

*A mi novio por su amor, cariño, comprensión y consejos.*

*A mi amiga por su cariño y ánimo en todos los instantes*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Estatal de Campinas por la oportunidad para realizar la experimentación en el Laboratorio de Procesos Fermentativos y Enzimáticos (LEPFE) de la Facultad de Ingeniería Química.

A la Doctora Aline Carvalho da Costa por la oportunidad, colaboración y orientación durante la pasantía en la Unicamp.

A la Doctora Maria Paola Maradei García por su valiosa orientación profesional y personal.

Al personal del Laboratorio de Procesos Fermentativos y Enzimáticos (LEPFE), por su colaboración incondicional especialmente a Luiza Martins.

A mis amigas y compañeras de convivencia en Brasil por su afecto, apoyo y hospitalidad Pâmela, Cintia, Elisa, Ana, Ângela y Daniela.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
1. INTRODUCCIÓN	15
2. ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO	17
2.1 Pretratamiento de bagazo de caña de azúcar	17
2.2 Deslignificación	19
2.3 Hidrólisis enzimática	19
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	21
3.1 Diagrama de bloques de la metodología experimental	21
3.2 Caracterización química del bagazo de caña.	22
3.3 Variables estudiadas en el diseño experimental	22
3.4 Pretratamiento con ácido fosfórico diluido	23
3.5 Deslignificación	24
3.6 Hidrólisis enzimática	24
3.7 Determinación de azúcares	25
3.7.1 Determinación de concentración de azúcares reductores totales (ART) mediante el método DNS	25
3.7.2 Determinación de concentración de glucosa mediante el método GOD- PAP	25
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	27
4.1 Caracterización química del bagazo de caña azúcar	27
4.2. Construcción de las curvas de calibración	28
4.2.1 Construcción de la curva de calibración de ART por el método DNS	28
4.2.2 Construcción de la curva de calibración de glucosa por el método GOD-PAP	29

4.3 Perfil de hidrólisis	29
4.4 Rendimiento de glucosa y ART	30
4.4.1 Rendimiento en el punto central	32
4.4.2 Influencia de la concentración de ácido fosfórico en el rendimiento conforme al tiempo de deslignificación	33
4.5 Residuo de bagazo después de la hidrólisis	37
4.5.1 Masa no hidrolizada en el punto central	38
4.5.2 Influencia de la concentración de ácido fosfórico en la masa no hidrolizada conforme al tiempo de deslignificación	38
4.6 Diagrama de Pareto	42
5. CONCLUSIONES	44
6. RECOMENDACIONES	45
7. BIBLIOGRAFÍA	46
8. ANEXOS	49

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Esquema de pretratamiento en biomasa lignocelulósica [11].	18
Figura 2. Diagrama de bloques de la metodología experimental.	21
Figura 3. Curva de calibración de ART por el método DNS.	28
Figura 4. Curva de calibración de glucosa por el método GOD-PAP	29
Figura 5. Perfil de hidrólisis para el ensayo con mejor rendimiento	30
Figura 6. Rendimiento de glucosa y ART después de la hidrólisis para todos los ensayo realizados según el diseño experimental	32
Figura 7. Influencia de la concentración de ácido fosfórico en el rendimiento cuando se realizó el pretratamiento durante 60 minutos y 10 g/L de NaOH en la deslignificación.	33
Figura 8. Influencia de la concentración de ácido fosfórico en el rendimiento cuando se realizó el pretratamiento durante 60 minutos y 40 g/L de NaOH en la deslignificación.	34
Figura 9. Influencia de la concentración de ácido fosfórico en el rendimiento cuando se realizó el pretratamiento durante 120 minutos y 10 g/L de NaOH en la deslignificación.	35
Figura 10. Influencia de la concentración de ácido fosfórico en el rendimiento cuando se realizó el pretratamiento durante 120 minutos y 40 g/L de NaOH en la deslignificación.	36
Figura 11. Residuo de bagazo después de la hidrólisis enzimática para todos los ensayos del diseño experimental.	37
Figura 12. Influencia de la concentración de ácido fosfórico en la masa no hidrolizada cuando se realizó el pretratamiento durante 60	

minutos y se emplearon 10 g/L de NaOH en la etapa de deslignificación.	39
Figura 13. Influencia de la concentración de ácido fosfórico en la masa no hidrolizada cuando se realizó el pretratamiento durante 60 minutos y se emplearon 40 g/L de NaOH en la etapa de deslignificación.	40
Figura 14. Influencia de la concentración de ácido fosfórico en la masa no hidrolizada cuando se realizó el pretratamiento durante 120 minutos y se emplearon 10 g/L de NaOH en la etapa de deslignificación.	41
Figura 15. Influencia de la concentración de ácido fosfórico en la masa no hidrolizada cuando se realizó el pretratamiento durante 120 minutos y se emplearon 40 g/L de NaOH en la etapa de deslignificación.	42
Figura 16. Diagrama de Pareto para la masa de ART liberada después de la hidrólisis enzimática.	43

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Factores estudiados en el diseño experimental	22
Tabla 2. Matriz completa del diseño experimental	23
Tabla 3. Caracterización química del bagazo de caña de azúcar	27
Tabla 4. Valor promedio y desviación estándar del rendimiento en el punto central	32
Tabla 5. Valor promedio y desviación estándar de la masa no hidrolizada en el punto central	38
Tabla C.1. Absorbancia de la solución de glucosa después de la reacción con DNS	51
Tabla C.2. Absorbancia de la solución de glucosa después de la reacción (GOD-PAP)	52

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo A. Reactivos Químicos empleados	49
Anexo B. Equipos empleados.	50
Anexo C. Lecturas de absorbancia para la construcción de las curvas de calibración	51
Anexo D. Matriz completa del diseño experimental con sus respectivas producciones de glucosa y ART	53
Anexo E. Perfil de hidrólisis de todos los ensayos del diseño experimental	54

## RESUMEN

**TÍTULO:** EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DEL PRETRATAMIENTO DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR CON ÁCIDO FOSFÓRICO SEGUIDO DE DESLIGNIFICACIÓN CON HIDRÓXIDO DE SODIO.\*

**AUTORA:** Paula Catalina Hoyos Vásquez\*\*

**PALABRAS CLAVE:** bagazo de caña de azúcar, pretratamiento, ácido fosfórico, deslignificación, hidrólisis enzimática.

### DESCRIPCION:

En este trabajo fue estudiado el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar con ácido fosfórico diluido seguido de deslignificación con hidróxido de sodio. El objetivo del presente trabajo es la determinación de un procedimiento de pre-tratamiento de bagazo de caña de azúcar que permita favorecer el rendimiento en azúcares durante la hidrólisis enzimática. Para ello se realizó un diseño factorial  $2^4$  con tres puntos centrales, que permitió evaluar la influencia de factores como tiempo y concentración tanto en el pretratamiento como en la etapa de deslignificación de la caña de azúcar; factores que afectan la producción de azúcares fermentables. El desempeño del proceso fue medido mediante la cuantificación de la producción de azúcares reductores totales y de glucosa después de la hidrólisis enzimática con enzimas de celulasa y  $\beta$ -glucosidasa. Los resultados mostraron que la máxima producción fue de 0,40 g de glucosa /g de biomasa seca y 0,62 g de ART/g de biomasa seca (Azúcares Reductores Totales) con un rendimiento de 99,5% y 99,59% en peso, respectivamente. Estos resultados fueron obtenidos para un pretratamiento realizado a condiciones de 2h, 5 g/L de ácido fosfórico y 124°C; seguido por el proceso de deslignificación llevado a cabo durante 30 min con NaOH 40 g/L y 100°C y finalmente se realizó una hidrólisis enzimática con 10 FPU de celulasa/ g de bagazo pretratado y 10 CBU de  $\beta$ -glucosidasa/g de bagazo pretratado.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ingenierías fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Dra. Aline Carvalho Universidad Estatal de Campinas-Brasil; Codirectora: Dra. Maria Paola Maradei Universidad Industrial de Santander-Colombia.

## ABSTRACT

**TITLE:** EXPERIMENTAL EVALUATION OF PRETREATMENT OF SUGARCANE BAGASSE WITH PHOSPHORIC ACID FOLLOWED BY DELIGNIFICATION WITH SODIUM HYDROXIDE.\*

**AUTHOR:** Paula Catalina Hoyos Vásquez.\*\*

**KEYWORDS:** sugar cane bagasse, pretreatment, phosphoric acid, delignification enzymatic hydrolysis.

### SUMMARY:

In this work the pretreatment of sugarcane bagasse with diluted phosphoric acid with further delignification with sodium hydroxide was evaluated. The aim of this work was to develop a procedure to render sugarcane bagasse susceptible to the enzymatic hydrolysis to produce sugars that can be used for second generation ethanol production. A  $2^4$  factorial design with three central points was carried out with the purpose of evaluate the influencing factors as time and concentration for both stages, pretreatment and delignification of the sugarcane bagasse which could lead to a major fermentable sugars production. The process performance was measured by determination of the production of total reducers sugars (ART) with DNS method and glucose with GOD-PAP method after enzymatic hydrolysis with cellulase and  $\beta$ -glucosidase enzymes. Results showed that the maximum concentration obtained was 0.40 g glucose/ g of dry biomass and 0.62 g ART/ g of dry biomass with 99.51wt% and 99.59wt%, respectively where pretreatment was performed at 124°C, for 2h and 40 g/L phosphoric acid followed by delignification with 40 g/L NaOH, during 30 min at 100°C and finally enzymatic hydrolysis was performed with 10 FPU of cellulase/ g of pretreated bagasse and 10 CBU of  $\beta$ -glucosidase/g of pretreated bagasse.

---

\* Graduation project.

\*\* Physicochemical Faculty. Chemical Engineering School. Director: Doctora. Aline Carvalho State University of Campinas-Brasil; Codirector: Doctora. María Paola Maradei Industrial University of Santander -Colombia.

## 1. INTRODUCCIÓN

La demanda energética acelerada y la disminución de las fuentes de energías no renovables están provocando que la producción de energía a bajo costo llegue a su fin, originando problemas sociales y ambientales por el cambio climático. Surge entonces, la necesidad de aumentar la producción de energías renovables y sustentables de alta calidad, con bajo consumo energético e impacto ambiental.

La propuesta de producción de biocombustibles a partir de recursos renovables ha generado dudas y preguntas acerca de su viabilidad. Por tanto, diversas investigaciones están trabajando en el desarrollo de tecnologías que contrarresten dichos inconvenientes. Surgen entonces soluciones como los biocombustibles de segunda generación debido a que sus impactos ambientales son positivos sin destruir áreas de gran biodiversidad, deforestar o degradar los suelos.

El uso de materiales lignocelulósicos, como el bagazo de caña para la producción de biocombustibles, ofrece grandes ventajas ya que permiten el incremento de la oferta de alcohol sin necesidad de aumentar el área de caña de azúcar plantada, además es un material de costo mínimo, listo para su uso [1].

Sin embargo, para que esto sea posible, es necesario someter estos materiales a una etapa previa que facilite el ataque enzimático durante la etapa de fermentación. Este pretratamiento constituye una de las etapas más costosas debido al precio de los reactivos utilizados y la generación de productos inhibidores. Por ello los estudios se han dedicado a desarrollar pretratamientos eficientes a bajo costo y que minimicen la producción de dichos inhibidores [2,3].

Estudios muestran el uso eficaz de soluciones 2-6 g/L de ácido fosfórico en la hidrolización de materiales lignocelulósicos convirtiéndolo en un agente de gran potencial para mejorar la productividad de azúcares fermentables producidos

durante la hidrólisis enzimática. Cabe aclarar igualmente que además de ello tiene la particularidad de ser fácilmente reciclable y recuperable [4,5].

El objetivo de este trabajo es evaluar la etapa de pretratamiento del bagazo de caña de azúcar con ácido fosfórico diluido para la producción de azúcares fermentables que pueden ser usadas para la producción posterior de etanol como biocombustible.

## **2. ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO**

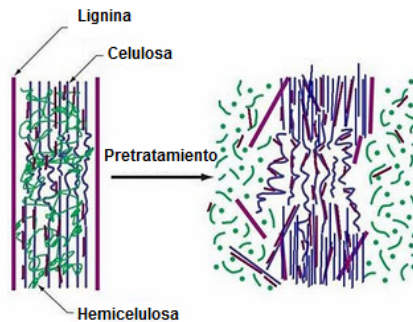
Los métodos y procedimientos existentes como la explosión a vapor y CO<sub>2</sub>, la ozonólisis o pretratamientos biológicos para la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos, a pesar de sus ventajas, son costosos y complejos [6,7]. Es necesario entonces, el desarrollo de nuevas técnicas y métodos que permitan la conversión de estos materiales en etanol en un proceso viable económicamente.

### **2.1 PRETRATAMIENTO DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR**

El pretratamiento de materiales lignocelulósicos tiene como objetivo principal, desarticular las estructuras cristalinas de la celulosa, así como remover o modificar la matriz de la lignina y la hemicelulosa, aumentando el área superficial y el tamaño del poro para hacerlos más vulnerables al ataque enzimático.

Un pretratamiento efectivo en términos económicos y de rendimiento debe reunir características como: a) producir fibras celulósicas reactivas al ataque enzimático, b) evitar la degradación de la hemicelulosa y celulosa, c) evitar la formación de posibles inhibidores de enzimas hidrolíticas y microorganismos de fermentación, d) minimizar la demanda de energía, e) reducir el costo por reducción de tamaños de la materia prima, f) reducir el costo de materiales de construcción para reactores de pretratamiento, g) producir menos residuos y h) usar una química limpia [8].

Figura 1. Esquema de pretratamiento en biomasa lignocelulósica [11].



### **Pretratamiento con ácido diluido**

Es probablemente uno de los métodos de pretratamiento químicos más empleados. No es efectivo disolviendo lignina pero puede transformarla además de incrementar la susceptibilidad de la celulosa a la hidrólisis enzimática y remover casi en 100% la hemicelulosa [9].

Sin embargo, la mayor desventaja en pretratamientos con bajo pH es la formación de diferentes tipos de inhibidores como ácidos carboxílicos, furanos y compuestos fenólicos que, aunque no afectan la hidrólisis enzimática, inhiben el crecimiento microbiano y la fermentación.

Las metodologías más usadas y evaluadas están basadas en el uso de ácido sulfúrico [10, 11, 12]. No obstante también se han realizado estudios con ácido nítrico, ácido clorhídrico y ácido fosfórico.

El ácido fosfórico puede ser considerado como un agente de gran potencial en la descomposición de la estructura cristalina de celulosa, debido a su bajo costo, fácil reutilización y reciclado, además de ser un agente menos corrosivo.

## **2.2 DESLIGNIFICACIÓN**

Aunque la deslignificación se ha enfocado tradicionalmente en procesos de pulpa de madera para producción de papel, se hace necesario implementar su aplicación en procesos que utilizan biomasa lignocelulósica como materia prima en la obtención de bioetanol.

Durante el proceso de deslignificación, la biomasa lignocelulósica es atacada alcalinamente con peróxido de hidrógeno, cloro, sulfuro de sodio e hidróxido de sodio, entre otros, los cuales actúan produciendo un hinchamiento de las paredes celulares que conforman la biomasa, aumentando por ende el área superficial interna, rompiendo la matriz de lignina, separando los iones estructurales y fragmentando las moléculas de lignina en segmentos o grupos más pequeños que la hacen más soluble en el álcali.

Las reacciones que tienen lugar durante este proceso aun no son del todo conocidas por la complejidad de la molécula de lignina, el mecanismo parece estar basado en la saponificación de enlaces ésteres intermoleculares [13]. De hecho se sabe que la efectividad de esta etapa depende del contenido del material a tratar.

## **2.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA**

Es una reacción química catalizada por enzimas, la cual consiste en la ruptura de las moléculas poliméricas de azúcar presentes en la celulosa y hemicelulosa produciendo azúcares reductores incluyendo glucosa.

Las enzimas presentan alta especificidad en relación al sustrato y su utilización reduce la obtención de productos indeseables como ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, los cuales actúan como inhibidores en la etapa de fermentación disminuyendo tanto el costo de separación de productos como los

problemas de tratamientos de efluentes. De hecho, la hidrólisis enzimática es más económica comparada con otros tipos de hidrólisis porque usualmente es realizada bajo condiciones moderadas y no presenta problemas de corrosión en los equipos [14].

Entre los factores que la afectan están el sustrato, la actividad de la enzima y las condiciones de reacción (temperatura, pH y otros parámetros). Para mejorar el rendimiento de este proceso los estudios se han enfocado en la optimización de dichos factores con el fin de aumentar la actividad de las enzimas [15].

### **Enzimas celulolíticas**

Son obtenidas de microorganismos de origen fúngico y bacteriano que provienen principalmente de microorganismos *Trichoderma sp.*, *Aspergillus niger* y *Bacillus subtilis*. Existen en la actualidad diversos preparados enzimáticos comerciales que principalmente contienen actividad celulolítica (endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, exo- $\beta$ -1,4-glucanasa,  $\beta$ -1,4-glucosidasa) las cuales actúan en forma sinérgica en el proceso de degradación de la celulosa.

La endoglucanasa modifica la estructura cristalina descomponiendo los enlaces internos  $\beta$ -1,4 de la celulosa y exponiendo las cadenas individuales de celulosa.

La exoglucanasa produce tetra o disacáridos, como la celobiosa, dividiendo las unidades de glucosa desde los extremos de las cadenas expuestas obtenidas por la endoglucanasa.

La betaglucosidasa, además de hidrolizar la celobiosa para la obtención de los monosacáridos de glucosa, disminuye el efecto inhibitorio de esta en la endo y exoglucosidasa.

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental comprende cuatro etapas principales: pretratamiento del bagazo de caña, deslignificación, hidrólisis enzimática y determinación de azúcares e hidrolizado. En la figura 3 se muestra el diagrama de la metodología empleada y en el transcurso del capítulo se describirán las diferentes etapas realizadas en este trabajo experimental.

#### 3.1 DIAGRAMA DE BLOQUES DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Figura 2. Diagrama de bloques de la metodología experimental.



### 3.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL BAGAZO DE CAÑA.

El bagazo de caña empleado en el pretratamiento fue previamente caracterizado obteniéndose el porcentaje de humedad y cenizas, así como la cantidad de extractivos, lignina soluble e insoluble y carbohidratos. El procedimiento seguido en este trabajo es el presentado en los trabajos de Rabelo [16], Garzón [17] y Rueda [18].

### 3.3 VARIABLES ESTUDIADAS EN EL DISEÑO EXPERIMENTAL

En el diseño experimental se estudiaron cuatro variables o factores del proceso: tiempo de pretratamiento (min), concentración de  $H_3PO_4$  (g/L), tiempo de deslignificación (min) y concentración de NaOH (g/L). Se presentan los valores de los niveles de cada factor en la Tabla 1.

Tabla 1. Factores estudiados en el diseño experimental

Factores	Niveles		
	-1	0	1
Tiempo de pretratamiento (min)	60	90	120
Concentración de $H_3PO_4$ (g/L)	5	22,5	40
Tiempo de deslignificación (min)	30	45	60
Concentración de NaOH (g/L)	10	25	40

Se realizó un diseño factorial  $2^4$  con tres puntos centrales. La matriz completa del diseño experimental se muestra en la tabla 2.

### 3.4 PRETRATAMIENTO CON ÁCIDO FOSFÓRICO DILUIDO

Teniendo en cuenta el porcentaje de humedad medido en la muestra de bagazo de caña se procedió a pesar 10 g de muestra, aproximadamente, los cuales fueron mezclados con 100 ml de solución de ácido fosfórico a diferente concentración, tiempo y temperatura según lo indicado en el diseño experimental.

Tabla 2. Matriz completa del diseño experimental

Ensayo	Concentración de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	Tiempo de pretratamiento (min)	Concentración de NaOH (g/L)	Tiempo de deslignificación (min)
1	5	60	10	30
2	5	120	10	30
3	40	60	10	30
4	40	120	10	30
5	5	60	10	60
6	5	120	10	60
7	40	60	10	60
8	40	120	10	60
9	5	60	40	30
10	5	120	40	30
11	40	60	40	30
12	40	120	40	30
13	5	60	40	60
14	5	120	40	60
15	40	60	40	60
16	40	120	40	60
17 (C)	22,5	90	22,5	45
18 (C)	22,5	90	22,5	45
19 (C)	22,5	90	22,5	45

El procedimiento fue realizado adicionando 0,5 mL de muestra, 1 mL de tampón citrato 0,05 M y 3 mL de solución DNS. Las muestras fueron llevadas a un baño termostático a 95°C durante 5 minutos y para interrumpir la reacción se transfirieron a un baño helado durante 10 minutos. Finalmente las muestras fueron leídas en el espectrofotómetro con longitud de onda de 540 nm [19, 20].

Una vez realizada la curva de calibración con glucosa, se procedió a determinar los ART en las alícuotas de hidrolizado obtenidas de la hidrólisis enzimática. Para ello fue necesario hacer diluciones de cada muestra. El procedimiento utilizado fue el mismo mostrado en el párrafo anterior.

### **3.5 DESLIGNIFICACIÓN**

Las muestras de bagazo húmedo previamente hidrolizado fueron tratadas con 1 mL de solución de NaOH / g de bagazo en base seca y llevadas al shaker con agitación de 130 rpm. Cumplido el tiempo de agitación, las muestras fueron colocadas en un baño helado para interrumpir la reacción. La concentración de la solución, el tiempo y la temperatura de la reacción fueron indicadas por el diseño experimental.

Posteriormente, las muestras fueron lavadas hasta pH neutro, exprimidas a mano hasta retirar el exceso de agua, almacenadas en bolsas plásticas y llevadas a refrigeración. Finalmente, se determinó el porcentaje de humedad de cada muestra.

### **3.6 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA**

Muestras de 3g aproximadamente de bagazo pretratado y deslignificado fueron agregadas a 100 mL de solución tampón citrato 0,05 M, teniendo en cuenta el agua presente en el material. El pH de las muestras fue ajustado a 4,8, cargadas con 10 FPU /g de bagazo pretratado (enzima celulasa) y 10 CBU/g de bagazo pretratado (enzima  $\beta$ -glucosidasa) e incubadas en el shaker con agitación de 100 rpm y 50°C de temperatura.

Alícuotas de 2 mL del hidrolizado fueron tomadas en tiempos de 30 min, 4, 8, 12, 24, 36, 48 y 72h, filtradas y llevadas a congelación.

### **3.7 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES**

#### **3.7.1 Determinación de concentración de azúcares reductores totales (ART) mediante el método DNS**

Partiendo de una solución estándar de glucosa de concentración 1 mg/mL preparada con tampón citrato 0,05 M (la solución estándar fue preparada con tampón citrato con el fin de usar el mismo medio que se emplea en la hidrólisis enzimática), se hicieron diluciones entre 0 y 1 mg/mL para realizar la respectiva curva de calibración. Fue necesario hacer diluciones de las alícuotas de hidrolizado.

El procedimiento fue realizado adicionando 0,5 mL de muestra, 1 mL de tampón citrato 0,05 M y 3 mL de solución DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Las muestras fueron llevadas a un baño termostático a 95°C durante 5 minutos y para interrumpir la reacción se transfirieron a un baño helado durante 10 minutos. Finalmente las muestras fueron leídas en el espectrofotómetro con longitud de onda de 540 nm [19, 20].

Una vez realizada la curva de calibración con glucosa, se procedió a determinar los ART en las alícuotas de hidrolizado obtenidas de la hidrólisis enzimática. Para ello fue necesario hacer diluciones de cada muestra. El procedimiento utilizado fue el mismo mostrado en el párrafo anterior.

#### **3.7.2 Determinación de concentración de glucosa mediante el método GOD-PAP**

A partir de una solución estándar de glucosa de concentración 5 mg/mL elaborada con tampón citrato 0,05 M, fueron preparadas diluciones entre 0 y 5 mg/mL para construir la curva de calibración.

A cada 20  $\mu\text{L}$  de las disoluciones fueron adicionados 25 mL de mono-reactivo, las muestras fueron llevadas a un baño termostático a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, posteriormente fueron colocadas en un baño helado durante 10 minutos para detener la reacción y adicionados 3mL de agua destilada. Finalmente se realizó la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro con longitud de onda de 540 nm. Una vez realizada la curva de calibración con glucosa, se procedió a determinar el contenido de glucosa en las alícuotas de hidrolizado obtenidas de la hidrólisis enzimática. Para ello fue necesario hacer diluciones de cada muestra. El procedimiento utilizado fue el mismo mostrado en el párrafo anterior.

## 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 4.1 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL BAGAZO DE CAÑA AZÚCAR

Los resultados del análisis de composición química del bagazo de caña de azúcar se encuentran en la Tabla 3.

**Tabla 3. Caracterización química del bagazo de caña de azúcar**

Propiedad	Valor promedio $\pm$ desviación estándar (% en peso)
Humedad	9,43 $\pm$ 0,06
*Cenizas	2,31 $\pm$ 0,23
*Celulosa	36,53 $\pm$ 3,19
*Hemicelulosa	25,38 $\pm$ 0,10
*Lignina total	19,10 $\pm$ 0,85
*Extractivos	7,25 $\pm$ 0,43

\*Los análisis fueron realizados por personal perteneciente al LEPFE

Para la caracterización del bagazo se determinó previamente el contenido de humedad y cenizas. De acuerdo con los resultados obtenidos los compuestos presentes en el bagazo en mayor proporción son celulosa, hemicelulosa y lignina, la cual comprende lignina soluble e insoluble, los cuales concuerdan con los resultados reportados en la literatura [21]. En menores cantidades se encuentran los extractivos y otros que abarcan contenido de furfural, hidroximetilfurfural, fenoles y grupos acetiles.

## 4.2. CONSTRUCCIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN

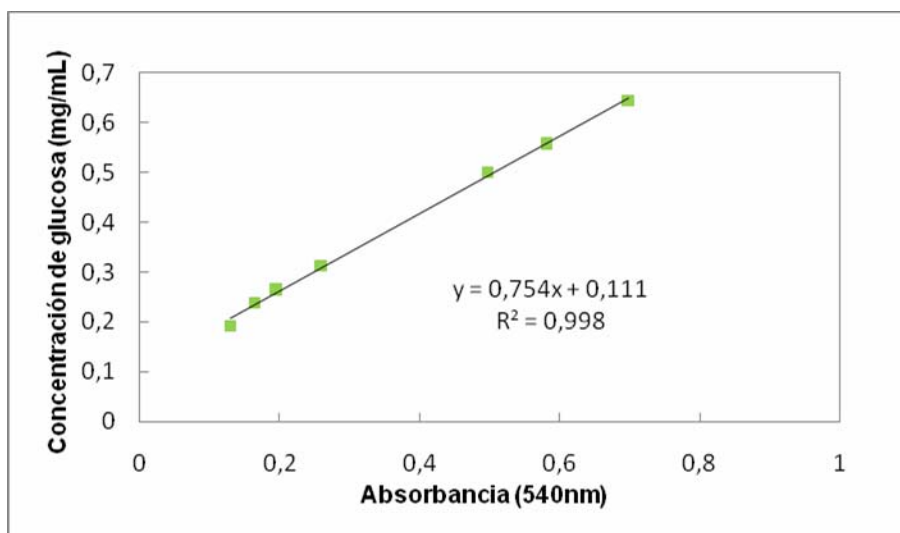
### 4.2.1 Construcción de la curva de calibración de ART por el método DNS

Para la determinación de la concentración de ART (Azúcares Reductores Totales) fue construida una curva de calibración usando muestras de glucosa mediante el método DNS (Ácido 3,5-Dinitrosalicílico).

La longitud de onda de máxima absorción (540 nm) fue determinada previamente [19].

La Figura 3 presenta la curva de calibración de concentración de ART en función de la absorbancia por medio del método DNS, (ver Anexo C).

Figura 3. Curva de calibración de ART por el método DNS.

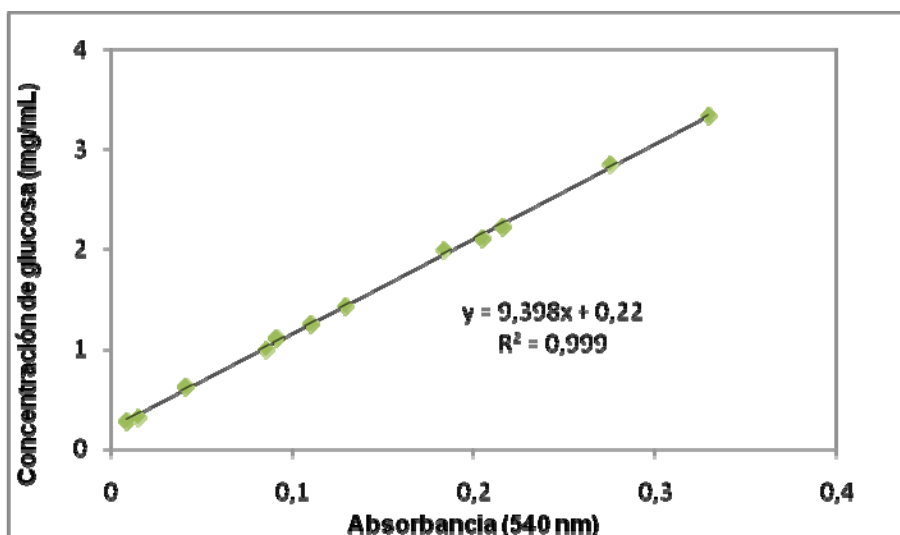


#### 4.2.2 Construcción de la curva de calibración de glucosa por el método GOD-PAP

Se construyó una curva de calibración para determinar la concentración de glucosa por medio del método GOD-PAP (**ver anexo C**).

En la figura 4 muestra la curva de calibración construida en función de la absorbancia.

Figura 4. Curva de calibración de glucosa por el método GOD-PAP

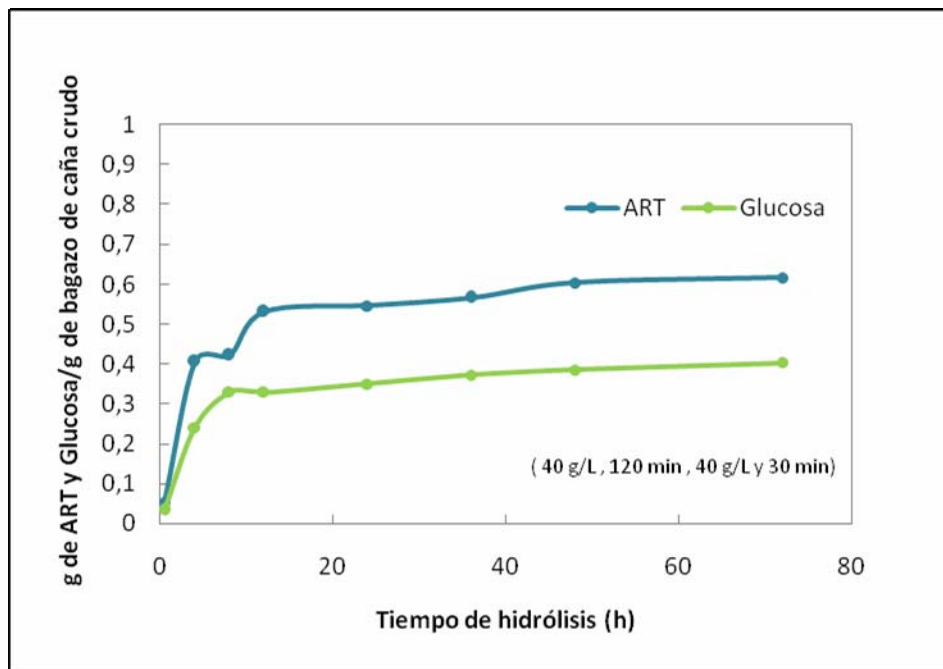


#### 4.3 PERFIL DE HIDRÓLISIS

En todos los ensayos fue analizada la masa de glucosa y ART liberadas en función del tiempo de hidrólisis. Se percibe una ligera inhibición en las primeras horas de hidrólisis causada posiblemente por la celobiosa liberada que no es convertida prontamente en glucosa [20]. De manera general, la mayor producción de azúcares es alcanzada después de las 36 h de hidrólisis aproximadamente, la cual, tiende a conservarse constante hasta el final de la hidrólisis (72h) (**ver anexo D**).

La figura 5 muestra el perfil de hidrólisis de uno de los ensayos donde puede observarse al final de la hidrólisis (72h) una producción de aproximadamente 0,62 g de ART/g de bagazo sin pretratar y 0,47 g de glucosa/g bagazo sin pretratar. En el **Anexo E** puede observarse los perfiles de todas las pruebas realizadas.

Figura 5. Perfil de hidrólisis para el ensayo con mejor rendimiento



En el **anexo D** se presenta el diseño experimental completo, donde se observa las cuatro variables estudiadas y sus correspondientes rendimientos de glucosa y ART al final de la hidrólisis.

#### 4.4 RENDIMIENTO DE GLUCOSA Y ART

La figura 6 presenta los rendimientos de glucosa y ART después de la hidrólisis del bagazo en cada uno de los ensayos del diseño experimental. Estos

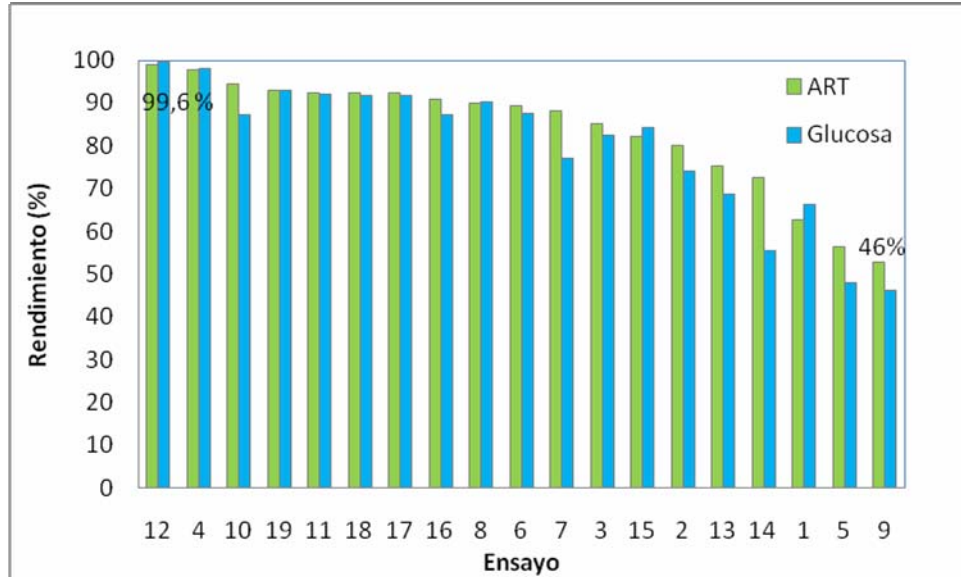
rendimientos fueron calculados mediante la ecuación 1, presentada a continuación:

$$Rto(\%) = \frac{\text{g de glucosa hidrolizada}}{\text{g de glucosa y hemicelulosa en el bagazo sin pretratar}} \times 100 \quad (1)$$

\*Cantidades teóricas de glucosa y hemicelulosa reportadas en la caracterización del bagazo de caña (ver tabla 3)

En la figura 6 se puede observar que el mejor rendimiento de glucosa fue alcanzado en el **ensayo 12** (40 g/L de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 120 min en el pretratamiento y 40 g/L de NaOH, 30 min en la deslignificación) donde 0,40 g de glucosa/ g de celulosa fueron liberados después de la hidrólisis correspondientes a 99,6 % en peso y el peor rendimiento ocurrió en el **ensayo 9** (5 g/L de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 60 min en el pretratamiento y 40 g/L de NaOH, 30 min en la deslignificación) donde fueron producidos y cuantificados escasamente 0,21 g de glucosa/ g de celulosa equivalentes a 46% en peso. Inicialmente, se puede decir que el uso de condiciones más severas en el pretratamiento tiene mayor influencia en la producción de azúcares fermentables que las condiciones en la etapa de deslignificación.

Figura 6. Rendimiento de glucosa y ART después de la hidrólisis para todos los ensayo realizados según el diseño experimental



#### 4.4.1 Rendimiento en el punto central

La tabla 4 muestra el valor promedio y la desviación estándar del punto central (pretratamiento: 22,5 g/L y 90 min; deslignificación: 25 g/L y 45 min) siendo este último relativamente bajo. Esto permite asegurar la buena reproductibilidad de todos los datos obtenidos experimentalmente bajo el protocolo de pretratamiento y deslignificación presentado en la metodología.

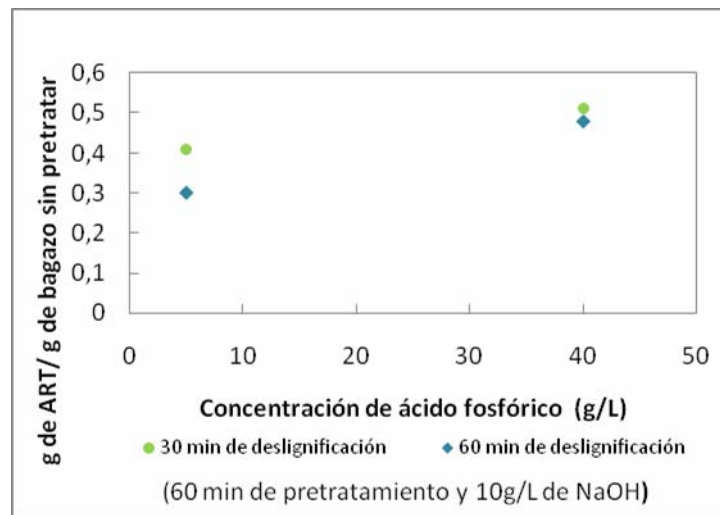
Tabla 4. Valor promedio y desviación estándar del rendimiento en el punto central

Ensayo	g de ART/ g de bagazo sin pretratar	Valor promedio $\pm$ desviación estándar
17	91,82	<b>92,23 <math>\pm</math> 0,66</b>
18	91,87	
19	92,99	

#### 4.4.2 Influencia de la concentración de ácido fosfórico en el rendimiento conforme al tiempo de deslignificación

La figura 7 muestra la influencia de la concentración de  $H_3PO_4$  cuando se realizó el pretratamiento durante 60 minutos y 10 g/L de NaOH en la etapa de deslignificación. Se observa que el mejor rendimiento fue obtenido donde se mantuvo la concentración de ácido en el mayor nivel analizado (40 g/L de  $H_3PO_4$ ). Nótese que cuando el tiempo de deslignificación fue el mínimo se obtuvo mejores rendimientos independientemente de la concentración de  $H_3PO_4$  empleada. Sin embargo, vale aclarar que a bajas concentraciones de ácido fosfórico, el tiempo de deslignificación tiene una mayor influencia sobre el rendimiento obtenido de ART, siendo este último mayor cuando el tiempo es menor.

Figura 7. Influencia de la concentración de ácido fosfórico en el rendimiento cuando se realizó el pretratamiento durante 60 minutos y 10 g/L de NaOH en la deslignificación.



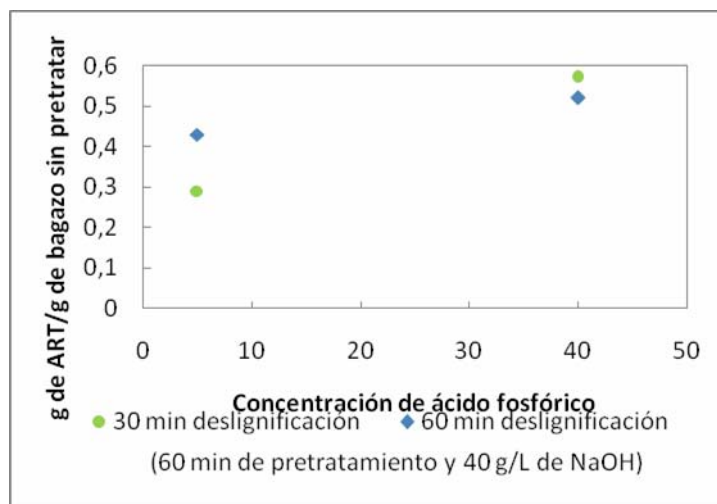
Los resultados cuando la concentración de NaOH es más importante (40 g/L en lugar de 10 g/L) son presentados en la figura 8. Para efectos de comparación las

otras condiciones de operación se mantuvieron en los mismos valores que las presentadas en la figura 7.

Nuevamente el mejor rendimiento se presentó cuando la concentración de ácido fosfórico fue máxima (40g/L de  $H_3PO_4$ ), independiente del tiempo de deslignificación. Sin embargo, aunque a concentraciones de ácido fosfórico elevado no parece haber influencia del tiempo de deslignificación, se observa, como ocurre a concentraciones de NaOH bajas, que éste tiene una influencia apreciable sólo cuando la concentración de  $H_3PO_4$  es baja.

La concentración de NaOH mantenida en su mayor nivel (40 g/L) tuvo una leve influencia sobre la producción de azúcares comparada con los ensayos donde fue empleada una concentración 10g/L de NaOH (figura 7).

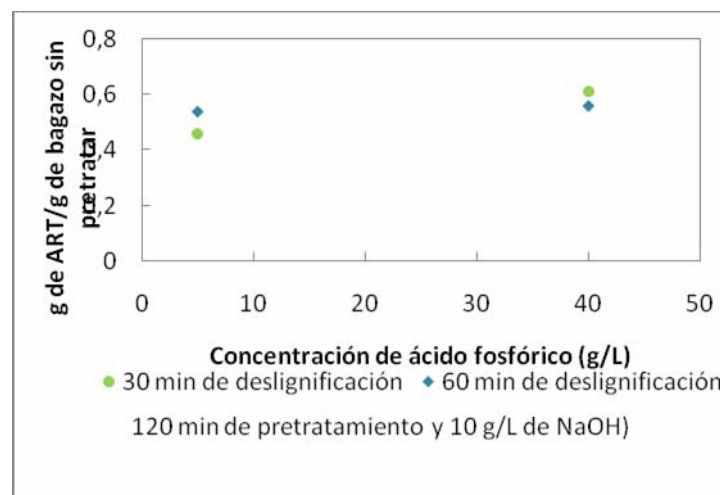
Figura 8. Influencia de la concentración de ácido fosfórico en el rendimiento cuando se realizó el pretratamiento durante 60 minutos y 40 g/L de NaOH en la deslignificación.



La figura 9 permite observar el efecto de la concentración de ácido fosfórico cuando el tiempo de pretratamiento es el más alto (120 min). Para efectos de comparación las otras condiciones de operación se mantuvieron en los mismos valores que las presentadas en la figura 7.

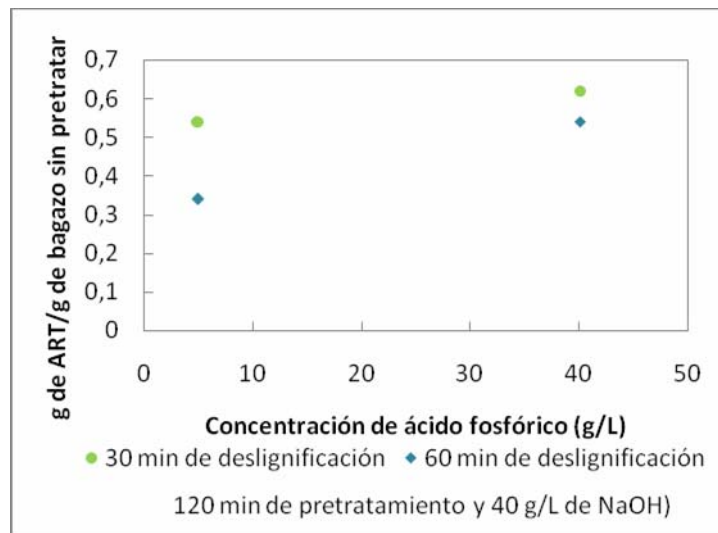
Se observa una vez más que los mejores rendimientos se presentan cuando la concentración de  $H_3PO_4$  es máxima (40g/L), indiferente del tiempo de deslignificación. Esta indiferencia del rendimiento con el tiempo de deslignificación es observable igualmente a bajas concentraciones de ácido fosfórico a la diferencia de lo observado para tiempos de pretratamiento más cortos (figuras 7 y 8), lo que lleva a pensar que el tiempo de pretratamiento tiene un efecto más importante sobre el rendimiento en ART a diferencia del tiempo de deslignificación. De hecho los rendimientos en ART obtenidos para pretratamientos de 120 min y usando 10 g/L de NaOH oscilan entre 0,4 y 0,6 g de ART/g de bagazo (figura 9) comparados con los obtenidos para pretratamientos de 60 min, los cuales no son superiores de 0,4 g de ART/g de bagazo aproximadamente (figura 7).

Figura 9. Influencia de la concentración de ácido fosfórico en el rendimiento cuando se realizó el pretratamiento durante 120 minutos y 10 g/L de NaOH en la deslignificación.



La importancia del tiempo de pretratamiento con respecto al tiempo de deslignificación es observable igualmente en la figura 10, la cual muestra la influencia de la concentración de ácido fosfórico en pruebas donde el pretratamiento fue realizado durante 120 min pero con una concentración elevada de NaOH (40 g/L) durante la deslignificación. De acuerdo con la figura los rendimientos en ART obtenidos en estas condiciones y para concentraciones elevadas de ácido fosfórico oscilan entre 0,5 y 0,65 g de ART/g de bagazo comparados con los obtenidos para pretratamientos de 60 min, los cuales no son superiores de 0,6 g de ART/g de bagazo aproximadamente (figura 8).

Figura 10. Influencia de la concentración de ácido fosfórico en el rendimiento cuando se realizó el pretratamiento durante 120 minutos y 40 g/L de NaOH en la deslignificación.

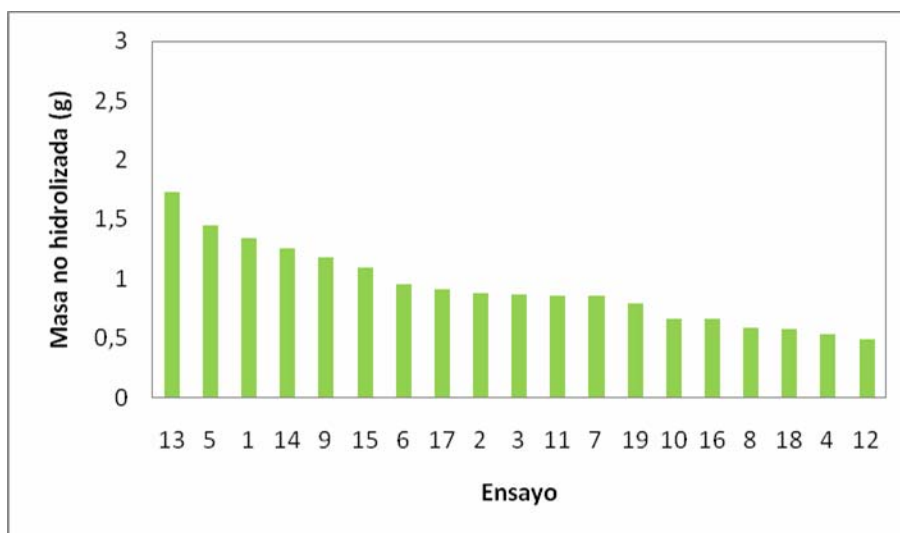


De los análisis anteriores se infiere que condiciones severas en la etapa de pretratamiento (40 g/L de  $H_3PO_4$  durante 120 minutos) favorecen el rendimiento en la producción de azúcares fermentables, y se evidencia que las condiciones en la deslignificación aportan una menor influencia en el proceso [18].

#### 4.5 RESIDUO DE BAGAZO DESPUÉS DE LA HIDRÓLISIS

El residuo de bagazo después de la hidrólisis indica la masa de bagazo que no se hidroliza. Se observa en la figura 11 que la conversión más deficiente tuvo lugar en el **ensayo 13** (5 g/L de  $H_3PO_4$ , 60 min en el pretratamiento y 40 g/L de NaOH, 60 min en la deslignificación) donde 57,6% de la masa no fue hidrolizada y la mayor conversión ocurrió en el **ensayo 12** (40 g/L de  $H_3PO_4$ , 120 min en el pretratamiento y 40 g/L de NaOH, 30 min en la deslignificación) en el cual 16,3% de la masa no fue hidrolizada. De lo anterior, la cantidad de masa no hidrolizada en el proceso posiblemente está relacionada principalmente con el uso de condiciones suaves en el pretratamiento (5g/L de  $H_3PO_4$  durante 60 minutos) y no tanto por las condiciones de la etapa de deslignificación.

Figura 11. Residuo de bagazo después de la hidrólisis enzimática para todos los ensayos del diseño experimental.



#### 4.5.1 Masa no hidrolizada en el punto central

La tabla 5 presenta el valor promedio y la desviación estándar del punto central (pretratamiento: 22,5 g/L y 90 min; deslignificación: 25 g/L y 45 min) relacionada con la masa no hidrolizada en el procedimiento. Estas repeticiones representan buena reproducibilidad con una desviación estándar baja.

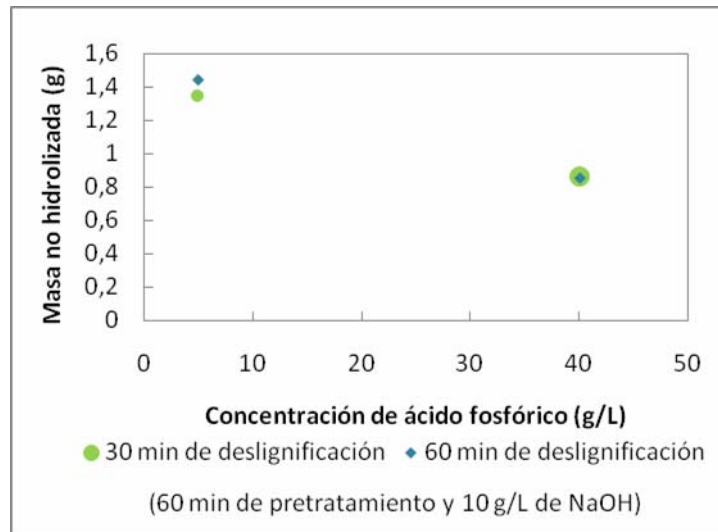
Tabla 5. Valor promedio y desviación estándar de la masa no hidrolizada en el punto central

Ensayo	Masa no hidrolizada	Valor promedio $\pm$ desviación estándar
17	0,9099	0,76 $\pm$ 0,17
18	0,5754	
19	0,7896	

#### 4.5.2 Influencia de la concentración de ácido fosfórico en la masa no hidrolizada conforme al tiempo de deslignificación

La figura 12 muestra la influencia de la concentración de  $H_3PO_4$  cuando se realizó el pretratamiento durante 60 minutos y 10 g/L de NaOH en la deslignificación. Las mayores pérdidas se ocasionaron en los ensayos donde se usó una baja concentración de  $H_3PO_4$  durante el pretratamiento (5 g/L de). Se observa que el tiempo de deslignificación no influye sobre la concentración de ácido fosfórico empleado.

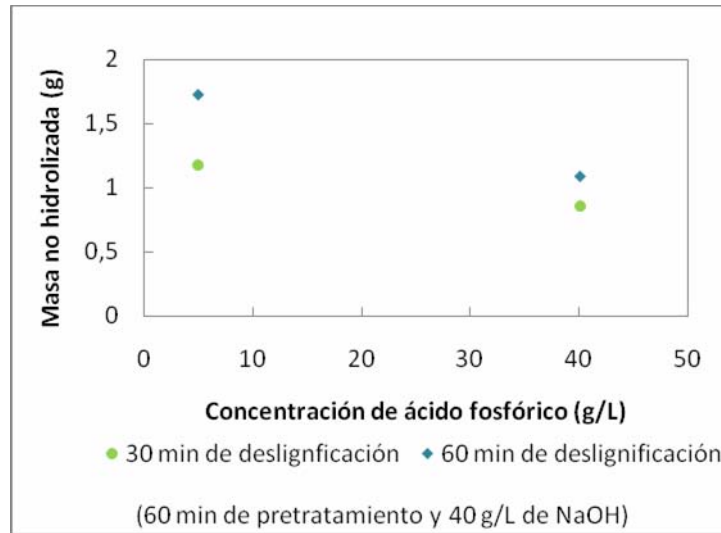
Figura 12. Influencia de la concentración de ácido fosfórico en la masa no hidrolizada cuando se realizó el pretratamiento durante 60 minutos y se emplearon 10 g/L de NaOH en la etapa de deslignificación.



La figura 13 presenta la influencia de la concentración de  $H_3PO_4$  para pretratamiento de duración más importante (120 min) y concentraciones de NaOH más elevadas (40 g/L) durante la etapa de deslignificación. Nuevamente se observa que las pérdidas más importantes se ocasionaron en los ensayos donde se mantuvo baja concentración de ácido fosfórico en el pretratamiento (5 g/L de  $H_3PO_4$ ).

Comparando con la figura 12; en este caso el tiempo de deslignificación influye más notoriamente en la cantidad de masa no hidrolizada, sobre todo a bajas concentraciones de ácido fosfórico indicando una influencia más importante de la etapa de deslignificación cuando la cantidad de NaOH es alta).

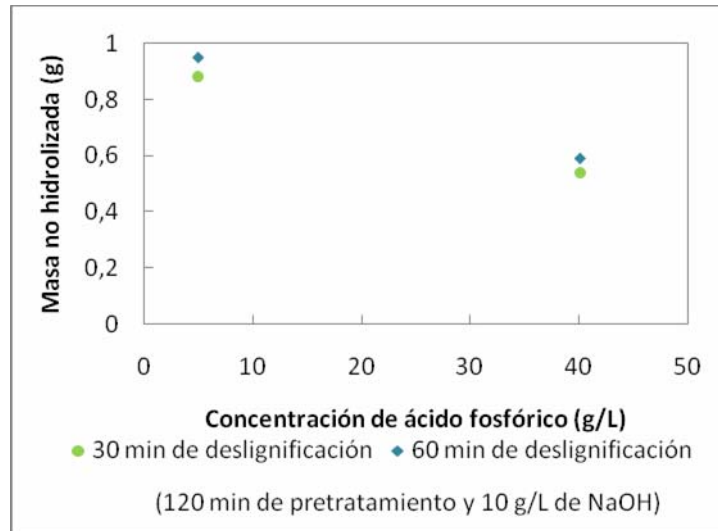
Figura 13. Influencia de la concentración de ácido fosfórico en la masa no hidrolizada cuando se realizó el pretratamiento durante 60 minutos y se emplearon 40 g/L de NaOH en la etapa de deslignificación.



La figura 14 es comparable con la figura 12 puesto que se mantienen constante las mismas variables experimentales a excepción del tiempo de pretratamiento, que en este caso es de 120 min. Como se observó para un tiempo de pretratamiento de 60 min, la mayor cantidad de masa no hidrolizada es obtenida cuando se empleó baja concentración de ácido fosfórico (5 g/L). Igualmente se observa que el tiempo de deslignificación no presenta mayor influencia en la cantidad de masa no hidrolizada.

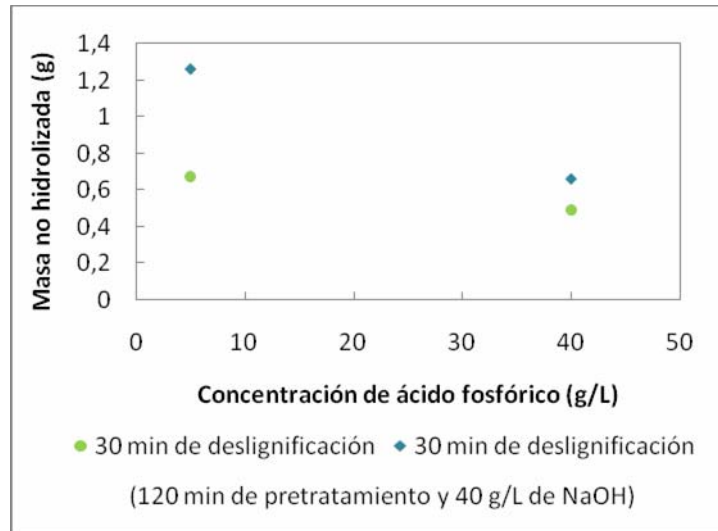
Por otra parte, se observa que la cantidad de masa que no se hidrolizó durante pretratamientos largos es menor comparada con los obtenidos en pretratamientos cortos para las dos concentraciones de ácido fosfórico estudiadas.

Figura 14. Influencia de la concentración de ácido fosfórico en la masa no hidrolizada cuando se realizó el pretratamiento durante 120 minutos y se emplearon 10 g/L de NaOH en la etapa de deslignificación.



La figura 15 muestra la influencia de la concentración de ácido fosfórico en ensayos donde fue realizado el pretratamiento durante 120 minutos y 40 g/L de NaOH. Para pretratamientos a estas condiciones los perfiles de masa no hidrolizada son idénticos a los observados a bajos tiempos de pretratamiento e igual concentración de base (figura 13). La mayor cantidad de masa no hidrolizada nuevamente se presenta cuando fue empleada una baja concentración de ácido fosfórico (5 g/L) y es notable que el tiempo de deslignificación tiene gran influencia sobre la cantidad de masa que no se hidrolizó, sobre todo a baja concentración de ácido como lo muestra igualmente la figura 13 para una concentración de NaOH más baja (10 g/L).

Figura 15. Influencia de la concentración de ácido fosfórico en la masa no hidrolizada cuando se realizó el pretratamiento durante 120 minutos y se emplearon 40 g/L de NaOH en la etapa de deslignificación.



Se puede decir que las pérdidas asociadas a la masa que no se hidroliza están favorecidas primordialmente por condiciones menos severas en el proceso de pretratamiento (5 g/L de  $H_3PO_4$  y 60 min) y a tiempo máximo de deslignificación, principalmente.

#### 4.6 DIAGRAMA DE PARETO

La figura 16 muestra el gráfico de Pareto el cual permite observar en orden descendente la importancia de los factores estudiados en el diseño experimental e identificar posibles interacciones entre los mismos, la línea punteada muestra la proporción que el efecto debe tener para ser estimado significativo.

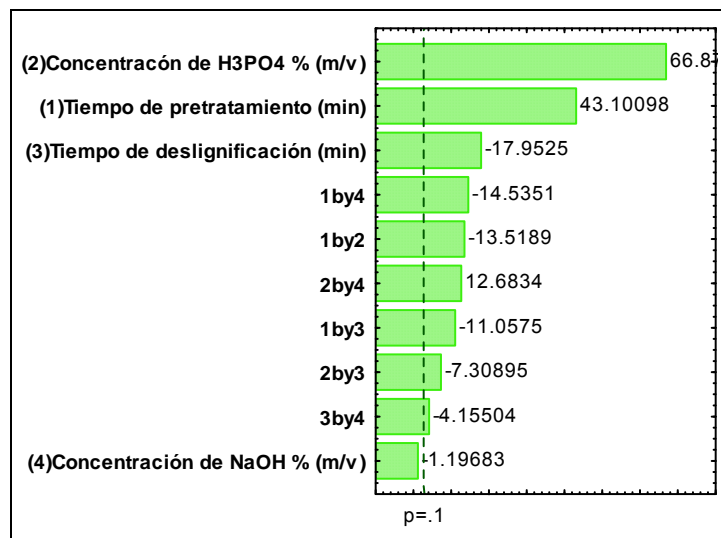
Del diagrama puede decirse que los factores de mayor importancia son la concentración de ácido fosfórico y tiempo en el pretratamiento respectivamente. Sus signos positivos sugieren que los mejores rendimientos en el proceso deben

ser obtenidos cuando estos factores fueron mantenidos en sus niveles máximos (40 g/L de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> durante 120 min); lo cual se refuerza con los análisis hechos anteriormente a partir de la figura 10.

Se observa una interacción (2by4) entre la concentración de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y de NaOH lo que representa una influencia recíproca entre estos y su signo positivo, advierte nuevamente, que la mayor productividad del proceso de obtiene cuando estos factores son estudiados en sus valores máximos (40g/L H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y 40 g/L de NaOH). Lo cual se refuerza con lo observado en las figuras 8 y 10.

Aunque los demás factores e interacciones no son considerados muy relevantes, según el diagrama de Pareto no quiere decir que no sean importantes durante el proceso experimental.

Figura 16. Diagrama de Pareto para la masa de ART liberada después de la hidrólisis enzimática.



## 5. CONCLUSIONES

- Fue evaluado el desempeño del pretratamiento de bagazo de caña de azúcar con ácido fosfórico diluido seguido de deslignificación con hidróxido de sodio para mejorar la susceptibilidad a hidrólisis enzimática.
- La presencia de ácido fosfórico en el pretratamiento llevó a mayores índices de sacarificación ácida de la celulosa en comparación con experimentos de auto-hidrólisis.
- Se observó que la máxima producción del pretratamiento con ácido fosfórico se obtiene cuando se mantuvieron las condiciones de pretratamiento más severas (40 g/L de  $H_3PO_4$ , 120 min). Además se observó que no existe mayor influencia de las variables estudiadas en la etapa de deslignificación.
- El uso de ácido fosfórico en el proceso de pretratamiento del bagazo de caña de azúcar para posterior producción de etanol como combustible podrá consolidarse como una alternativa atractiva, debido al buen rendimiento en la etapa de hidrólisis (99,6 % en peso) para las condiciones más severas.

## 6. RECOMENDACIONES

- Realizar lecturas del medio hidrolizado por medio de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) para la cuantificación de los azúcares y obtener una visión más específica de cuales azúcares componen los ART.
- Evaluar las características físicas, químicas y estructurales de la lignina proveniente del bagazo pretratado para que sea posible su aprovechamiento.
- Determinar la carga mínima enzimática de celulasa y glucosidasa capaz de llevar a un alto rendimiento en el proceso.
- Cuantificar la formación de compuestos en la etapa de pretratamiento que inhiben la hidrólisis enzimática.
- Evaluar la fermentación del proceso optimizado para la cuantificar el rendimiento en etanol.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. SCHLITTLER, L. A. F. S. Engenharia de um bioprocesso para a produção de etanol de cana-de-açúcar. Rio Janeiro: Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006. Tese (Mestrado).
2. MATS GALBE, M. ZACCHI, G. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. *Avd. Biochem Engin/Biotechnol*, v. 41–65, 2007.
3. KUMAR P, BARRETT D. M, DELWICHE M. J, STROEVE P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 48, 3713–3729, 2009.
4. VÁSQUEZ M. P, DA SILVA J, DE SOUZA M. B JR., PEREIRA N. JR. Enzymatic Hydrolysis Optimization to Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.136–140, p. 141-153, 2007.
5. UM BYUNG-HWAN, M. NAZMUL KARIM, AND LINDA L. HENK. Effect of Sulfuric and Phosphoric Acid Pretreatments on Enzymatic Hydrolysis of Corn Stove. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 105–108, p.115-25, 2003.
6. SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 39/40, p. 587-600, 2002.
7. MOHAMMAD J. T, KEIKHOSRO K, Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to improve Ethanol and Biogas Production: A Review, 2008.

8. HSU, T. A. Pretreatment of Biomass. In: Wyman, C.E. (Ed.), Handbook on Bioethanol, Production and Utilization. Taylor & Francis, Washington, DC, 1996.
9. YANG, B.; WYMAN, C.E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, v 86, p.88-98, 2004.
10. GROHMANN, K., TORGET, R., HIMMEL, M. Diluted acid pretreatment of biomass at high solids concentrations. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*. 17: 59-80, 1985.
- 11.11. TORGET, R., HIMMEL, M., GROHMANN, K., 1992. Diluted acid pretreatment of two short-rotation herbaceous crop. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 34/35, p.115-123, 1992.
12. BUSTOS G., J.A. RAMÍREZ., G. GARROTE AND M. VÁZQUEZ. Modeling of the hydrolysis of sugar cane bagasse with hydrochloric acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.104, pp. 51–68, 2003.
13. SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 39/40, p. 587-600, 2002.
- 14.14. DUFF, S. J. B., MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, 55:33, 1996

15. BARROS N, B., SCARMIN, I. S, BRUNS, R. E. Como fazer experimentos – pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2ª ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2003.
16. RABELO C. avaliação de desempenho do pré-tratamento com Peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, 2007, Tese (Mestrado).
17. GARZÓN F. L, Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré-Tratamento com hidróxido de cálcio, 2009, Tese (Mestrado).
18. RUEDA S, Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-açúcar, 2010, Tese (Mestrado).
19. MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, 31(3):426-428, 1959.
20. BAZÁN, JUAN HERALDO VILOCHE. Estudo de produção enzimática da dextrana clínica. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos universidade Estadual de Campinas, 1993. Tese (Doutorado).
21. FENGEL, D., WEGENER, G. Wood Chemistry ultrastructure Reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 610 p, 1989.

## 8. ANEXOS

### Anexo A. Reactivos Químicos empleados

Reactivos	Fabricante	Pureza (% masa)
Ácido cítrico monohidratado	Ecibra	99,8
Ácido dinitro 3,5salicílico	Vetec	99
Ácido Fosfórico	Synth	85
Agua destilada		
Azida	Vetec	99
Enzima celulasa	Sigma	-
Enzima $\beta$ -glucosidasa	Sigma	-
Fenol	Nuclear	99
Glucosa anhidra	Synth	99
Hidróxido de sódio	Synth	97
Kit Glucose GOD-PAP	Laborlab	-
Meta-bissulfito de sódio	Vetec	99
Tartarato de sodio y potasio tetra hidratado	LaborLab	-

Anexo B. Equipos empleados.

<b>Equipo</b>	<b>Modelo</b>	<b>Precisión</b>	<b>Marca</b>
Autoclave vertical	AV 50	-	Phoenix
Agitador magnético con calentamiento	MA 085	-	Marconi
Balanza Analítica		± 0,001 g	Gehaka
Balanza Analítica	Mark 210A	± 0,001 g	Bel Engineering
Balanza	AS2000C	± 0,01 g	Marte
Analizador de humedad infrarrojo	IV 2000	± 0,001 g	Gehaka
Baño termostático	MA-184	± 0,01 °C	Marconi
Espectrofotómetro	600S	0,001 Abs	Femto
Estufa de secado	MA-035/2	-	Marconi
Incubadora refrigerada con agitación	MA-832	-	Marconi
Medidor de pH	DM-22	0,001	Digimed
Congelador	FFE24	-	Electrolux
Refrigerador	DF38	-	Electrolux
Tamiz para análisis y control granulométrico	150 TY /106µm		A bronzinox
Destilador de agua	Q341	-	Quimis
Bomba a/de vacío	MA-057/3	-	Marconi

Anexo C. Lecturas de absorbancia para la construcción de las curvas de calibración

Tabla C.1. Absorbancia de la solución de glucosa después de la reacción con DNS

<b>Absorbancia (540nm)</b>	<b>Concentración de glucosa (mg/mL)</b>
0,060	0,15
0,130	0,19
0,197	0,26
0,261	0,31
0,497	0,50
0,582	0,56
0,699	0,65
0,893	0,77
0,966	0,83
0,993	0,87

Tabla C.2. Absorbancia de la solución de glucosa después de la reacción (GOD-PAP)

<b>Absorbancia (540 nm)</b>	<b>Concentración de glucosa (mg/mL)</b>
0,009	0,28
0,015	0,32
0,041	0,63
0,085	1,00
0,091	1,11
0,110	1,25
0,129	1,43
0,183	2,00
0,205	2,11
0,216	2,22
0,275	2,86
0,329	3,33
0,513	5,00

Anexo D. Matriz completa del diseño experimental con sus respectivas producciones de glucosa y ART

Ensayo	Concentración de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	Tiempo de pretratamiento (min)	Concentración de NaOH (g/L)	Tiempo de deslignificación (min)	g de glucosa/ g de bagazo de caña sin pretratar	g de ART/ g de bagazo de caña sin pretratar
1	5	60	10	30	0,25	0,41
2	5	120	10	30	0,33	0,46
3	40	60	10	30	0,35	0,51
4	40	120	10	30	0,40	0,61
5	5	60	10	60	0,23	0,30
6	5	120	10	60	0,36	0,54
7	40	60	10	60	0,36	0,48
8	40	120	10	60	0,37	0,56
9	5	60	40	30	0,21	0,29
10	5	120	40	30	0,38	0,54
11	40	60	40	30	0,38	0,57
12	40	120	40	30	0,40	0,62
13	5	60	40	60	0,31	0,43
14	5	120	40	60	0,29	0,34
15	40	60	40	60	0,33	0,52
16	40	120	40	60	0,37	0,54
17 (C)	22,5	90	22,5	45	0,37	0,57
18 (C)	22,5	90	22,5	45	0,38	0,57
19 (C)	22,5	90	22,5	45	0,38	0,58

Anexo E. Perfil de hidrólisis de todos los ensayos del diseño experimental

