

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FQF
Facultad de
Química y Farmacia

Departamento de Química

TRABAJO DE DIPLOMA

Propuesta metodológica para la evaluación del
efecto del pretratamiento en la cachaza sin cera

Autor: Ana María Espinosa Negrín

Tutores: Dra. C. Lisbet Mailín López González

Dra. C. Neibys Lourdes Casdelo Gutiérrez

Santa Clara, Julio, 2020
Copyright©UCLV

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FQF
Facultad de
Química y Farmacia

Department of Chemistry

BACHELOR THESIS

Methodological proposal for evaluating the effect
of pretreatment on press mud without wax

Author: Ana María Espinosa Negrín

Supervisors: Dr. Sc. Lisbet Mailín López González

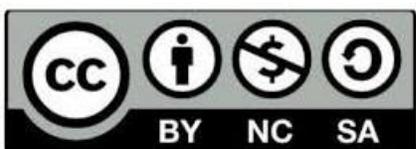
Dr. Sc. Neibys Lourdes Casdelo Gutiérrez

Santa Clara, July, 2020
Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubián” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

Atribución- No Comercial- Compartir Igual



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

“La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo progreso”.

Louis Pasteur

Dedicatoria

- * A la memoria de mi abuelo Juan.
- * A mi mamá Marilín y a mi papá Edel.
- * A mis tíos Migue y Sandra, y a abuelo Arsenio.
- * A mis compañeros de aula por tantos momentos que pasamos juntos.

Agradecimientos

- * A mi mamá, por ser mi guía, mi orientadora, por levantarme los ánimos cuando más lo necesitaba y siempre creer en mí.
- * A mi papá, por estar siempre tan orgulloso y tener esa confianza en mí que me hacía vencer los mayores obstáculos.
- * A mis tíos Migue y Sandra por ser mis segundos padres y ayudarme a crecer en la vida, siempre muy cerca de mí.
- * A mis queridos tíos Idolidia, Elio, Nena, Irma, Iraida, Ernesto, Roli, Luisito y a todos mis primos, por ayudarme cada vez que lo necesitaba y estar siempre pendientes de mi desarrollo.
- * A Héctor, por haberme acompañado durante tantos años y momentos y por cuidarme siempre.
- * A mis compañeros de aula, por los años de mi vida que nunca olvidaré.
- * A mis tutoras Lisbet y Neibys por su apoyo incondicional y por los buenos consejos.
- * A mis profesores de la UCLV por hacer crecer aún más mi amor por la ciencia.
- * A los trabajadores del CEEPI por haberme acogido tan bien en tan poco tiempo.
- * A todos los trabajadores del CIGB SS por contribuir a mi formación profesional y apoyarme durante tantos años de la carrera, pero en especial, a Mayteé, a Lisbe y a Yeosva.

RESUMEN

La caña de azúcar es el cultivo de mayor producción a nivel mundial y partir de ella se generan grandes cantidades de subproductos como la cachaza. De este material se extrae cera y el resto puede emplearse como fertilizante, pero a su vez, constituye una fuente atractiva para la generación de biogás que aún no se ha estudiado. Para mejorar la digestibilidad de la muestra con vista al proceso de digestión anaerobia se debe realizar un pretratamiento, siendo el termoalcalino uno de los más atractivos, y la evaluación de su efecto se realiza atendiendo a varios parámetros: la solubilización de la materia orgánica, pH, ácidos grasos volátiles, carbohidratos fibrosos (hemicelulosa, celulosa y lignina) y no fibrosos, y la presencia de compuestos inhibidores al proceso (fenólicos, furfural e hidroximetilfurfural). En el presente trabajo se realiza una propuesta metodológica para la evaluación del efecto del pretratamiento en la composición de los productos finales y en el rendimiento de metano de la cachaza sin cera.

ABSTRACT

Sugar cane is the crop with the highest worldwide production and large amounts of by-products such as press mud are produced from it. Wax is extracted from this material and the rest can be used as fertilizer but, at the same time, represent an attractive source for generation of biogas that has not yet been studied. In order to improve the digestibility of the sample for the anaerobic digestion process, a pre-treatment should be carried out, with thermo-alkaline being one of the most attractive, and the evaluation of its effect is based on various parameters: solubilization of organic matter, pH, volatile fatty acids, fibrous (hemicellulose, cellulose and lignin) and non-fibrous carbohydrates, and the presence of inhibitors compounds to the process (phenolic, furfural and hydroxymethylfurfural). In the present work, a methodological proposal is made for the evaluation of the effect of pretreatment on the composition of final products and on methane yield from press mud after wax extraction.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1.1) Industria de la caña de azúcar y derivados.....	5
1.2) Características de la cachaza y aplicaciones.....	5
1.3) Proceso de digestión anaerobia.....	7
1.4) Pretratamientos de biomasa lignocelulósica.....	9
1.4)1. Métodos de análisis químicos para evaluar los pretratamientos a la biomasa lignocelulósica.....	17
1.5) Caracterización físico-química de la biomasa lignocelulósica antes del pretratamiento.....	17
1.5)1. Sólidos totales, sólidos volátiles y cenizas.....	17
1.5)2. Extracción de cera.....	19
1.5)3. Determinación de proteínas.....	21
1.5)4. Determinación de carbohidratos no estructurales.....	22
1.5)5. Determinación de carbohidratos fibrosos.....	25
1.6) Caracterización físico-química de la biomasa lignocelulósica después del pretratamiento.....	29
1.6)1. Separación de las fracciones líquida y sólida.....	29
1.6)2. Separación de los extractivos en fracción sólida.....	29
1.6)3. Determinación de pH.....	31
1.6)4. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno Soluble.....	31
1.6)5. Determinación de ácidos grasos volátiles.....	32
1.6)6. Determinación de productos de degradación de azúcares.....	34
1.6)7. Determinación de productos de solubilización de la lignina.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS	40
2.1) Determinación de sólidos totales, volátiles y cenizas.....	40
2.2) Determinación de pH.....	41
2.3) Determinación de la DQO soluble.....	42
2.4) Determinación de alcalinidad.....	44
2.5) Cuantificación de azúcares reductores por el método de Miller.....	44
2.6) Extracción de cera.....	45
PROPUESTA METODOLÓGICA	48
3.1) Propuesta Metodológica para la evaluación del pretratamiento.....	48
3.2) Aplicación parcial de la propuesta.....	49

CONCLUSIONES	52
RECOMENDACIONES	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXOS	64
I. Expresiones para el cálculo de ST, SV y cenizas:	64
II. Determinación del porcentaje de ST, SV y cenizas:	64
III. Preparación de las disoluciones necesarias para calibración del pH-metro y el almacenamiento del electrodo:	64
IV. Preparación de disoluciones para el análisis de DQO:	65
V. Precauciones a tener en cuenta en el análisis de DQO:	67
VI. Cálculos para determinar la DQO por el método volumétrico	67
VII. Preparación de disoluciones para la determinación de alcalinidad.	68
VIII. Cálculos relacionados con la alcalinidad y la concentración de ácido acético. ...	69
IX. Cálculo de la concentración de AGV según Kapp.	69
XI. Curva de calibración empleada en la determinación colorimétrica de DQO:	71

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar, cultivo que crece fundamentalmente en las regiones tropicales y subtropicales, es el de mayor producción a nivel mundial, la cual en el año 2017 fue de 1 841 millones de toneladas. Esto se debe a la demanda de azúcar para consumo alimenticio y también a su uso como biocombustible (FAO, 2019). De la cosecha de la caña y su procesamiento industrial es posible obtener varios productos y subproductos que constituyen materia prima para la industria transformativa, química y bioquímica: azúcar, mieles, jugo, bagazo, cachaza, cenizas, etc (Taupier and Bugallo, 2000).

La cachaza es el residuo en forma de torta que se elimina en el proceso de clarificación del jugo de caña durante la fabricación de azúcar crudo (Taupier and Bugallo, 2000), con un contenido en materia orgánica, expresado como demanda química de oxígeno (DQO), de 86,2 g/L (González et al., 2013). Es un producto suave, esponjoso, amorfo y de color carmelita oscuro, que contiene hemicelulosa, celulosa, lignina, proteína, cera, azúcares, sales inorgánicas, sustancias albuminoides y otros compuestos que contienen carbono. Por cada 100 toneladas de caña molida se generan de 2,8 a 4,5 toneladas de cachaza (Pena Parra, 2019, Kumar et al., 2017, Velarde et al., 2004).

Debido a su composición química y bajo costo la cachaza encuentra diversas aplicaciones, entre las que se destaca su uso en la remoción de hidrocarburos de petróleo en suelos contaminados (García-Torres, 2011); como fertilizantes, sea cruda o después de un proceso de compostaje (Kumar et al., 2017, Sarangi et al., 2008, Sen and Chandra, 2007) y en la obtención de productos de alto valor agregado como la cera (Muñoz Solares, 2019, San Anastacio-Rebollar et al., 2017, Chakhathanbordee et al., 2016, Pérez-Morales and Villanueva-Ramos, 2012); bioetanol (Pawar et al., 2017) y biobutanol (Nimbalkar et al., 2017), así como en la producción de biogás (López-

González et al., 2019, Janke et al., 2019b, Janke et al., 2019a, López González et al., 2014, López González et al., 2013, Baez-Smith, 2008).

Una vez extraída la cera, el resto de la cachaza puede ser empleado como fertilizante, pero la cantidad de materia orgánica en el material restante hace que constituya una fuente atractiva para producir biogás (Varnero, 2011). Entre sus componentes se encuentran la hemicelulosa, celulosa y lignina, que por sus características estructurales dificultan el proceso de digestión anaerobia (DA). La realización de un tratamiento previo a la digestión permite incrementar la biodigestibilidad de la biomasa y la accesibilidad enzimática, lo cual resulta en un enriquecimiento en materiales fácilmente biodegradables y mejora de su conversión a biogás o etanol (Tahezadeh and Karimi, 2008).

Existen varios tipos de pretratamiento de materiales lignocelulósicos: físicos (molido e irradiación), químicos (con álcalis, ácidos, oxidantes y organosolventes), químico-físicos (extrusión, hidrotérmico y explosión de vapor) y biológicos (microorganismos y enzimáticos). En el caso de la cachaza se ha utilizado el pretratamiento hidrotérmico o por agua caliente presurizada (López González et al., 2014) y el termoalcalino con NaOH y Ca(OH)₂ (Janke et al., 2019b, López González et al., 2013).

Se ha demostrado que el uso de pretratamiento termoalcalino presenta diversas ventajas ya que logra altos niveles de delignificación y conversión de celulosa, además de una mejor solubilización de la biomasa (Chang et al., 2017, Nkemka et al., 2016, González et al., 2013, Tahezadeh and Karimi, 2008). Este tipo de pretratamiento se ha utilizado en varios sustratos (paja de arroz, rastrojo de maíz, paja de trigo, bagazo, cachaza y otros), con el fin de mejorar la cinética del proceso de digestión anaerobia y el rendimiento de metano (You et al., 2019, Xin et al., 2019, Shen et al., 2019, Chang et al., 2017, López González et al., 2013), pero no se ha

encontrado ningún estudio sobre su aplicación en la cachaza luego de una etapa de extracción de cera.

Teniendo en cuenta los aspectos antes mencionados, se puede plantear el siguiente problema científico: la falta de estudios del efecto del pretratamiento termoalcalino de la cachaza sin cera, limita conocer su efecto en la composición de los productos finales y en el rendimiento de metano de la cachaza sin cera.

Desde estos argumentos se plantea como **objetivo general**:

Definir una propuesta metodológica para la evaluación del efecto del pretratamiento en la composición de los productos finales y en el rendimiento de metano de la cachaza sin cera.

Para dar cumplimiento al objetivo general es necesario alcanzar los siguientes **objetivos específicos**:

1. Realizar una búsqueda bibliográfica del estado actual de los pretratamientos y la caracterización físico-química de la biomasa lignocelulósica antes y después de su aplicación.
2. Definir una propuesta metodológica para la evaluación del efecto del pretratamiento de la cachaza sin cera.
3. Aplicación parcial de la propuesta metodológica para la evaluación del efecto del pretratamiento de la cachaza sin cera.

Capítulo I: Revisión Bibliográfica

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1) Industria de la caña de azúcar y derivados.

La caña de azúcar, cultivo que crece fundamentalmente en las regiones tropicales y subtropicales, es el de mayor producción a nivel mundial, la cual en el año 2017 fue de 1 841 528 386 toneladas (FAO, 2019). Esto se debe fundamentalmente a la demanda de azúcar para consumo alimenticio y también a su uso como biocombustible. Se cultiva en más de un centenar de países: Suazilandia, Belice, Brasil, Mauritania, Guyana y Guatemala son los de mayor producción, superando las dos toneladas per cápita (FAO, 2019).

De la cosecha de la caña y su procesamiento industrial es posible obtener varios productos y subproductos que constituyen materia prima para la industria transformativa, química y bioquímica, como el azúcar, jugo, bagazo, cenizas, mieles y cachaza, los cuales dan lugar a más de medio centenar de productos de alto valor comercial (Taupier and Bugallo, 2000).

1.2) Características de la cachaza y aplicaciones.

La cachaza se puede definir como el residuo en forma de torta que se elimina en el proceso de clarificación del jugo de caña durante la fabricación de azúcar crudo y etanol (Fig. 1) (Janke et al., 2019b, Taupier and Bugallo, 2000). Por cada 100 toneladas de caña molida se generan de 2,8 a 4,5 de cachaza (Pena Parra, 2019, Kumar et al., 2017, Velarde et al., 2004). Es un producto suave, esponjoso, amorfo y de color carmelita oscuro cuya composición (Tabla 1) depende de varios factores: tipo de suelo, variedad de caña, tipo de cosecha (mecanizada o manual), grado de extracción del jugo, cantidad de cal y otros productos usados en la clarificación, métodos de filtración empleados y tamaño de los orificios de los coladores del jugo, entre otros (Kumar et al., 2017, Taupier and Bugallo, 2000).

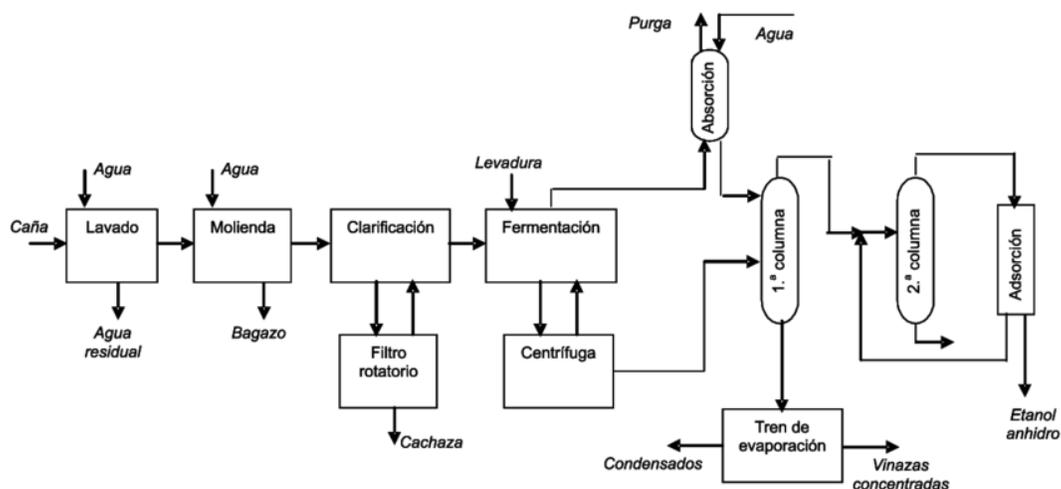


Fig. 1: Obtención de cachaza durante la producción de etanol (Montoya R et al., 2006).

Tabla 1. Composición química de la cachaza (Janke et al., 2019b, Janke et al., 2018, Kumar et al., 2017, González et al., 2014, González et al., 2013, Taupier and Bugallo, 2000).

Parámetros	Unidad	Valores
Sólidos Totales (ST)	%	85-95
Sólidos Volátiles (SV)	% bs	70-80
Cenizas	% bs	20-30
pH		6-6,3
DQO	g/L	80-90
DQO soluble (DQO _s)	g/L	10-20
Hemicelulosa	% bs	20-30
Celulosa	% bs	10-25
Lignina	% bs	8-15
Cera	% bs	8-15
Proteína	% bs	5-15
Azúcares	% bs	8-15

bs: base seca.

Debido a su composición química y bajo costo la cachaza encuentra diversas aplicaciones, entre las que se destaca su uso en la remoción de hidrocarburos de petróleo en suelos contaminados (García-Torres, 2011); como fertilizantes, sea cruda o después de un proceso de compostaje (José and Arellano, 2020, Devia-Orjuela et al., 2019, Kumar et al., 2017, Sarangi et al., 2008); en la obtención de productos de alto valor agregado como la cera (Muñoz Solares, 2019, San

Anastacio-Rebollar et al., 2017, Chakhathanbordee et al., 2016); bioetanol (Pawar et al., 2017) y biobutanol (Nimbalkar et al., 2017), y en la producción de biogás (López-González et al., 2019, Janke et al., 2019b, López González et al., 2014, López González et al., 2013).

1.3) Proceso de digestión anaerobia.

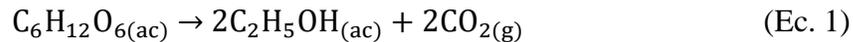
El biogás es una de las fuentes de energía sostenible que puede ser producida a partir de diferentes tipos de biomasa. Puede ser utilizado como fuente de calor (cocina, alumbrado), en la combustión en calderas de vapor para calefacción y como combustible de motores acoplados a generadores eléctricos (Varnero, 2011, Lorenzo and Abreu, 2005).

El potencial de biogás de un sustrato específico se define como la cantidad máxima de biogás que puede ser producida durante el proceso de digestión anaerobia (DA) y se da en relación con una fracción del sustrato (por ejemplo, SV o DQO) para reducir la incertidumbre provocada por el contenido de agua y de compuestos inorgánicos (Weinrich, 2018).

La DA es un proceso de degradación biológica de sustratos orgánicos en ausencia de oxígeno que da lugar a una mezcla de gases (principalmente metano (CH_4), y dióxido de carbono (CO_2)) conocida como "biogás", y a una suspensión acuosa o "lodo" que contiene los microorganismos responsables de la degradación de la materia orgánica, la cual ocurre en sucesivas etapas (Karuppiah and Ebenezer, 2019, Zhang et al., 2016a):

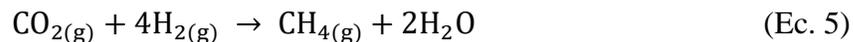
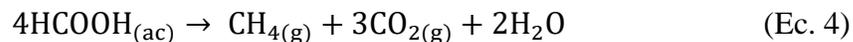
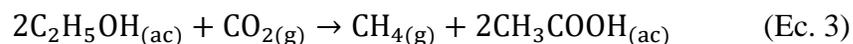
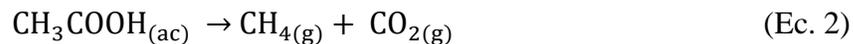
- Hidrólisis: La materia orgánica compleja se hidroliza a compuestos más simples: los carbohidratos son convertidos a azúcares; los lípidos, en ácidos grasos de cadena larga; y las proteínas, en aminoácidos (Gumisiriza et al., 2017, Ali Shah et al., 2014).

- Acidogénesis: Los compuestos orgánicos solubles productos de la hidrólisis son convertidos en ácido acético (CH_3COOH) y otros ácidos grasos de cadena más larga, conocidos como ácidos grasos volátiles (AGV), (principalmente propiónico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) y butírico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$)), alcoholes (Ec. 1), dióxido de carbono (CO_2) e hidrógeno (H_2) (Hernández-Beltrán et al., 2019, Meegoda et al., 2018):



- Acetogénesis: Los ácidos grasos de cadena más larga y los alcoholes son oxidados a ácido acético e hidrógeno (Karuppiah and Ebenezer, 2019).

- Metanogénesis: El ácido acético o el CO_2 y el H_2 son utilizados para producir CH_4 y CO_2 . Ocurre a un pH aproximadamente neutro (6,5-7,5), aunque el valor óptimo es 7,0-7,2. Las reacciones se pueden expresar como sigue (Karuppiah and Ebenezer, 2019):



En el proceso de DA influyen varios factores a tener en cuenta: pH, la presencia de AGV, compuestos tóxicos, la composición de la biomasa, etc (Lorenzo and Abreu, 2005). En el caso de la cachaza se destaca la presencia de compuestos lignocelulósicos que hacen que la estructura sea muy compleja y resistente al ataque de las bacterias, lo cual actúa en detrimento del rendimiento de metano y se hace necesaria una etapa de pretratamiento antes de la DA.

1.4) Pretratamientos de biomasa lignocelulósica.

Los materiales lignocelulósicos están compuestos por hemicelulosa, celulosa, lignina, extractables y numerosos materiales inorgánicos (Tahezadeh and Karimi, 2008).

La celulosa es un polisacárido lineal de glucosa de cientos de unidades con enlaces β -1,4-glicosídicos (fórmula molecular: $(C_6H_{12}O_5)_n$), compuesto por unidades de celobiosa (Fig. 2). Las cadenas de celulosa se encuentran empacadas por enlaces de hidrógeno en una estructura de microfibrillas (Xu et al., 2013), que son atacadas por hemicelulosa y otros polímeros como las pectinas, y se encuentra cubierta por lignina. Las microfibrillas también se encuentran asociadas en forma de haz o macrofibrillas. Esta estructura tan especial y complicada hace a la celulosa resistente al tratamiento químico y biológico (Tahezadeh and Karimi, 2008).

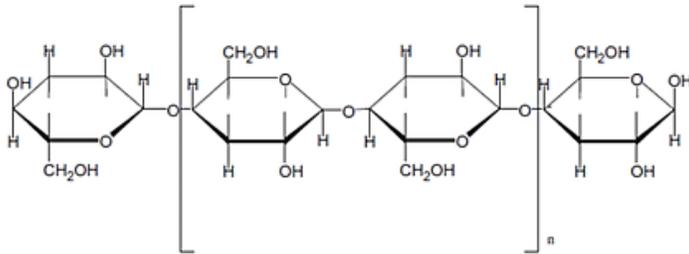


Fig. 2: Estructura de la celulosa. Fuente: (Tezara et al., 2016).

La hemicelulosa es otro polisacárido que naturalmente está conectado con microfibrillas de celulosa mediante enlaces no covalentes, y generalmente se compone de más de un tipo de unidad de monosacáridos, incluyendo tanto hexosas como pentosas (Xu et al., 2013): galactosa, glucosa, arabinosa y pequeñas cantidades de ramnosa, ácido glucurónico, ácido metilglucurónico y ácido galacturónico. Para maderas suaves, el monosacárido predominante es la manosa y en las maderas duras y residuos agrícolas, la xilosa (Fig. 3). En contraste con la

celulosa, que es cristalina y firme, la hemicelulosa tiene una estructura aleatoria, amorfa y enramada con baja resistencia a la hidrólisis (Taherzadeh and Karimi, 2008).

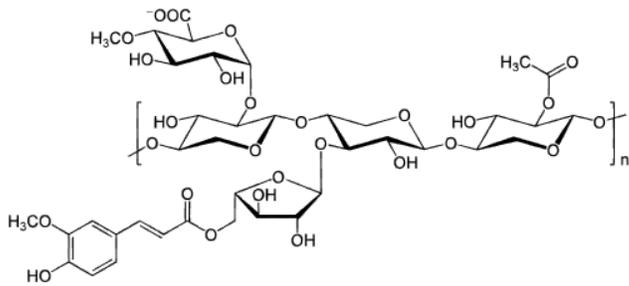


Fig. 3: Estructura de la hemicelulosa. Fuente: (Tezara et al., 2016).

La lignina es un polímero que consta de tres tipos de unidades de fenilpropano: alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico, y alcohol sinapílico (Xu et al., 2013), unidas en una estructura tridimensional particularmente difícil de degradar (Fig. 4). Es el componente de la pared celular vegetal que más resistencia ofrece a la degradación química y enzimática. Generalmente, las maderas suaves contienen más lignina que las maderas duras y la mayoría de los residuos de la agricultura (Taherzadeh and Karimi, 2008).

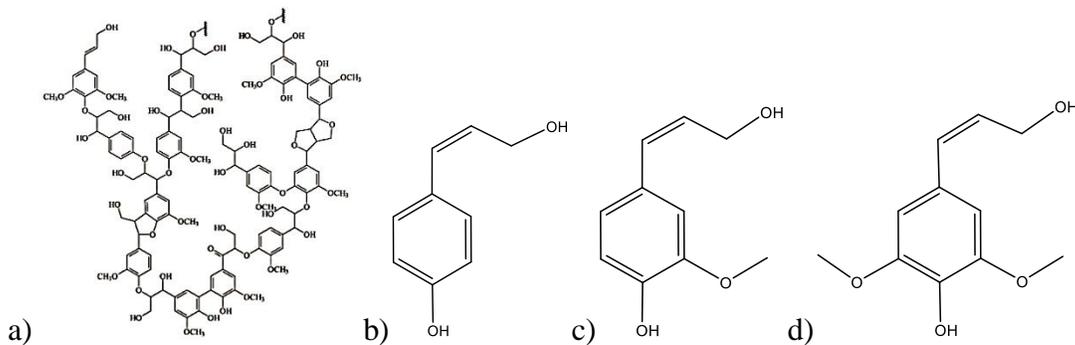


Fig. 4: a) Estructura de la lignina; b) alcohol p-cumarílico; c) alcohol coniferílico; y d) alcohol sinapílico. Fuente: (Hernández-Beltrán et al., 2019, Pérez et al., 2019).

El objetivo del pretratamiento es romper la capa de lignina que protege la celulosa y la hemicelulosa, para que la biomasa sea más accesible para la digestión. También ayuda a

disminuir la cristalinidad de la celulosa y a aumentar la porosidad. Algunas biomásas se degradan fácilmente, pero se forman ciertos inhibidores como el furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) y compuestos fenólicos; los primeros por descomposición de pentosas y hexosas, y los últimos por solubilización de la lignina (Karuppiah and Ebenezer, 2019, Zheng et al., 2014).

La aplicación de varios pretratamientos a la biomasa lignocelulósica mejoran la DA con un incremento en el rendimiento de biogás. Usualmente se clasifican en: físico, químico, físico-químico y biológico (Tabla 2), y su eficiencia varía según la biomasa y el tipo de pretratamiento (Abraham et al., 2020).

En el pretratamiento físico el tamaño de las partículas se reduce, lo cual conduce a un aumento en el área superficial de las partículas y el tamaño de poro, y a una disminución en la cristalinidad y grado de polimerización de la celulosa. Pueden ser mecánicos o por irradiación.

Los pretratamientos químicos tienen como función primaria remover la hemicelulosa y la lignina presentes en la biomasa y su modo de acción depende del agente químico (ácido, álcalis, oxidativo y orgánico) y las condiciones de operación (Tabla 3).

El pretratamiento ácido causa la interrupción de las fuerzas de Van der Waals, los enlaces de hidrógeno y los enlaces covalentes que mantienen unidos los componentes de la biomasa, provocando la lisis celular y la liberación de los compuestos orgánicos intracelulares. El más utilizado con este fin es el ácido sulfúrico pero también se ha reportado el uso de ácido acético, nítrico y clorhídrico. Cuando se utiliza el ácido nítrico y el sulfúrico, la producción de metano es menor, ya que estos se reducen a N_2 y H_2S , debido a la reducción de sulfatos y nitratos (Ec. 6 y 7) (Zheng et al., 2014, Hendriks and Zeeman, 2009).





Tabla 2. Efecto del pretratamiento sobre la alteración estructural y composicional de la biomasa lignocelulósica (Adaptado de (Abraham et al., 2020)).

Pre-tratamiento	Incrementa área superficial accesible	Decristaliza la celulosa	Solubiliza		Altera estructura de la lignina	Forma F/HMF
			HC	Lignina		
Mecánico	●	●				
Irradiación	●	○	○			○
EV	●	●	●	○	●	●
Extrusión	●	●				
LHW	●	●	●	○	○	○
Ácido	●	●	●	●/○	●/○	●
Alcalino	●	●	○	●/○	●	○
Oxidativo	●	ND	●	●/○	●	○
Osol	●	○				
MB	●	ND	●	●	●	
Enzimático	●	○	○	●	●	

●= Mayor efecto, ○=Menor efecto, ND=no determinado, y blanco=no efecto.

EV: Explosión al vapor; LHW: Agua caliente presurizada; Osol: solvente orgánico; MB: microbiológico; F: Furfural; HC: hemicelulosa.

El mecanismo del pretratamiento alcalino induce principalmente la hinchazón de las partículas orgánicas por acción de los aniones hidroxilo (OH^-) causando deslignificación y ruptura de los enlaces éster intermoleculares (Fig. 5), con ello aumenta la porosidad y el área superficial interna de la biomasa, y disminuye el grado de polimerización y la cristalinidad de la celulosa. Pueden emplearse soluciones de hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), hidróxido de potasio (KOH) y amoníaco (Karupiah and Ebenezer, 2019, Gumisiriza et al., 2017).

El NaOH es uno de los álcalis más efectivos para el pretratamiento pues se alcanza una elevada hidrólisis enzimática de la celulosa, respecto a otros álcalis (Rodrigues et al., 2016). Ha sido utilizado en varios materiales con resultados positivos; por ejemplo, para la paja de arroz pretratada a una carga de álcalis (CA) de 6 % (g de álcalis /100 g de ST de biomasa) se obtuvo

un aumento en el rendimiento de metano de 41,59 % y una disminución de un 33,8 % en la cantidad de lignina, respecto a la muestra sin pretratar (Xin et al., 2019).

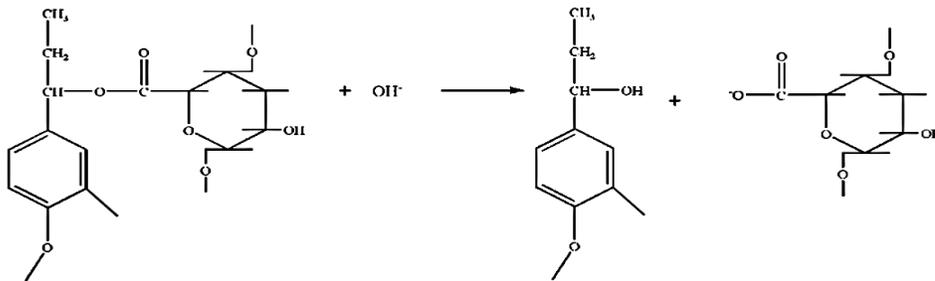


Fig. 5: Esquema de reacción del complejo carbohidrato-lignina con OH^- . Fuente: (Guan et al., 2018).

En el caso de la cachaza se ha reportado el uso de NaOH y Ca(OH)_2 , observándose incrementos en el rendimiento de metano respecto al material sin pretratar al trabajar a temperaturas en el rango de 45°C - 121°C y tiempos entre 20 y 60 min (Tabla 3). La solubilización de la DQO (calculada como $\text{DQO}_{\text{soluble}} \cdot 100 / \text{DQO}_{\text{total}}$) después del pretratamiento fue significativamente superior al de la cachaza sin pretratar para todas las combinaciones probadas en el estudio realizado por López González (2016). Esta varió entre 28 y 38 % en comparación con el control que solo alcanzó el 21,5 %. El máximo valor se obtuvo para 10 g Ca(OH)_2 /100 g ST con tres horas, resultando en un incremento de un 16,4 % respecto a la cachaza sin pretratar. Sin embargo, el pretratamiento con la mayor solubilización no fue el de mejor rendimiento de metano debido a la formación de compuestos inhibitorios y recalcitrantes al proceso de DA.

Con la adición de NaOH es posible utilizar valores de tiempo y temperatura inferiores a cuando se usa Ca(OH)_2 debido a su mayor poder cáustico. El efecto del pretratamiento con NaOH resulta en una mayor solubilización que el Ca(OH)_2 para severidades comparables (Zheng et al., 2014); sin embargo, su precio y el contenido de Na^+ a la salida de una planta de biogás pudiera

afectar su calidad como bioabono, lo que hace recomendable el uso de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Además, el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ puede ser recuperado como carbonato de calcio (CaCO_3) por inyección de CO_2 en la solución. Una mezcla de ambos álcalis tiene varias ventajas: mayor solubilización, incremento del rendimiento de metano, menor costo y un efluente con la calidad adecuada para el suelo.

El pretratamiento oxidativo promueve la ruptura de núcleos aromáticos, la sustitución electrofílica, dislocación de las cadenas laterales y apertura de los enlaces éter alquil-arílicos. Durante el mismo el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se convierte en radicales hidroxilo (OH^\bullet) que actúan sobre la biomasa, aunque el mecanismo es menos selectivo por lo que porciones de hemicelulosa y celulosa se pierden durante el proceso (Abraham et al., 2020).

Los solventes orgánicos son utilizados para separar celulosa de alta pureza de la biomasa lignocelulósica sin causar su degradación significativa. Se ha reportado el uso de varios solventes como alcoholes, ésteres, cetonas, ácidos, fenoles y éteres a temperaturas de 150-200°C, o a menores temperaturas si se utiliza un catalizador (Tahezadeh and Karimi, 2008).

Tabla 3. Efecto de pretratamientos físicos y químicos en la biomasa lignocelulósica.

Pretratamiento	Condiciones	Sustrato	Variación en el rendimiento de metano	Referencia
Molido	Mecánicas	Girasol mexicano	+22 %	(Dahunsi, 2019)
	Placas de malla gruesa	Hierba	+25 %	(Tsapekos et al., 2015)
Irradiación	Microondas	Paja de trigo, avena, cebada	No hubo incremento neto	(Sapci, 2013)
	Microondas y NaOH	Paja de arroz	+55%	(Kaur and Phutela, 2016)
	H_2SO_4 (5%), 121°C, 60 min	Jacinto de agua	+131%	(Sarto et al., 2019)

Ácido	H ₂ SO ₄ , HCl, CH ₃ COOH y H ₂ O ₂ (1,2,3,4%), 25 °C, 7 días	Rastrojo de maíz	+115 (3% H ₂ O ₂)	(Song et al., 2014)
Alcalino	Ca(OH) ₂ , 100°C, 60 min CA: 9,5 g/100 g _{cachaza}	Cachaza	+32%	(López González, 2016)
	NaOH, 45 °C, 30 min CA: 1,5; 3 y 6 g/100 g _(masa fresca)	Cachaza	+12 % (CA=1,5) +38 % (CA=3) +40 % (CA=6)	(Janke et al., 2016)
	NaOH, 75 °C, 60 min CA: 9,5 %	Cachaza	+12 %	(Obregón et al., 2018)
	NaOH, 121°C, 30 min CA: 6 g/100 g _(masa fresca)	Cachaza	+8 %	(Janke et al., 2019b)
Oxidante	H ₂ O ₂ (2.68 %), 6–18 días	Paja de arroz	+88 %	(Song et al., 2013)
	H ₂ O ₂ (4%), 55°C, 24 h	Tallo de girasol	+33 %	(Monlau et al., 2011)
Orgánico	Etanol (50%), 180°C, 1 h	Paja de trigo	+15 %	(Mancini et al., 2018)

CA: carga de álcali (g álcalis/100 g biomasa).

El pretratamiento físico-químico es una vía combinada con la que se rompen los enlaces de hidrógeno y se incrementa el área superficial, a temperaturas entre 50°C y 250°C (Tabla 4). El tiempo de pretratamiento es decisivo pues tiempos prolongados de exposición al calor conducen a mayor cantidad de inhibidores (Wilson and Novak, 2009). Se clasifican en: explosión de vapor, extrusión e hidrotérmico. El pretratamiento hidrotérmico utiliza agua caliente a temperaturas entre 120°C-230°C bajo altas presiones (Nitsos et al., 2013). El agua penetra la biomasa y causa la hidrólisis de la hemicelulosa en oligosacáridos solubles. Esta reacción es catalizada por iones H⁺, formados primero por autoionización del agua, y luego por el ácido acético producido por la liberación de los grupos O-acetil (Garrote et al., 1999). Este

pretratamiento ha sido utilizado en cachaza a 150°C por 20 min observándose un aumento del 63 % del rendimiento de metano y del 14 % para la solubilización de la DQO respecto al material sin pretratar (López González et al., 2014).

Los pretratamientos biológicos pueden realizarse por acción de microorganismos (bacterias y hongos) o de enzimas y de forma general constituyen procesos ecológicamente amigables con respecto a los físicos y químicos debido al menor requerimiento energético y al uso de condiciones leves (Abraham et al., 2020, Brémond et al., 2018).

Todos estos pretratamientos pueden combinarse para mejorar la biodegradabilidad de la biomasa y el rendimiento de metano, observándose incluso mejores resultados que cuando se utiliza solo uno de ellos (Du et al., 2019, Guan et al., 2018, Janke et al., 2019b).

Tabla 4. Efecto de pretratamientos físico-químicos y biológicos en diferentes sustratos.

Pretratamiento	Condiciones	Sustrato	Variación del rendimiento de metano	Referencia
EV	210°C, 10 min	Madera de abedul	+118 %	(Mulat et al., 2018)
	200°C, 1 min	Paja de arroz	+45,66 %	(Zhou et al., 2016)
	200°C, 1,5 min		+49,58 %	
200°C, 2 min	+74,8 %			
Extrusión	Extrusor de un solo tornillo	Ensilado de paja de maíz	+35 %	(Pilarski et al., 2016)
Hidrotérmico	120–180°C, 30–50 min	Paja de cártamo	+70 %	(Hashemi et al., 2019)
	150°C, 20 min	Cachaza	+63 %	(González et al., 2014)
MO	Fluido del rumen	Paja de arroz	+83 %	(Zhang et al., 2016b)
Enzimas	Celulosa	Rastrojo de maíz	+37 %	(Wang et al., 2018)

CA: carga de álcali (g álcalis/100 g biomasa); EV: explosión de vapor; MO: microorganismos.

1.4)1. Métodos de análisis químicos para evaluar los pretratamientos a la biomasa lignocelulósica.

Varios métodos han sido desarrollados para estudiar la composición de la biomasa lignocelulósica, entre ellos están: el de Van Soest, basado en el uso de detergentes para fraccionar la fibra y conservar la lignina en el análisis de forrajes (Van Soest, 1963), los métodos para determinar parámetros en los procesos relacionados al sector del biogás propuestos por el Centro de Investigación de Biomasa de Alemania (German Biomass Research Center) y los Procedimientos Analíticos Estándares para Biomasa empleados en Estados Unidos (2020), desarrollados estos últimos por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable (*National Renewable Energy Laboratory, NREL*).

NREL ha desarrollado un conjunto de procedimientos analíticos de laboratorio para caracterizar la biomasa lignocelulósica e investigar los cambios composicionales, químicos y estructurales después de un pretratamiento, y su efecto en la hidrólisis enzimática, enfocados en la conversión de biomasa a biocombustibles (biogás/bioetanol) (www.nrel.gov). Estos procedimientos incluyen la determinación de ST, SV y cenizas, el contenido de proteína, azúcares y sus productos de degradación y el análisis de carbohidratos y lignina (Sluiter et al., 2013).

1.5) Caracterización físico-química de la biomasa lignocelulósica antes del pretratamiento.

1.5)1. Sólidos totales, sólidos volátiles y cenizas.

Se define como sólidos totales (ST) al residuo del material que queda en el recipiente al evaporar a sequedad una cantidad de muestra determinada hasta llevar a peso constante a una temperatura definida (2018a). Durante este procedimiento se elimina el agua de la materia fresca, aunque en

el caso de sustratos con una fracción significativa de sólidos volátiles (como los forrajes) se debe considerar la pérdida de compuestos orgánicos durante el secado (Weinrich, 2018).

Se han realizado propuestas para corregir el contenido de ST en diversos materiales (ensilado de maíz, sorgo y otros cereales, hierba, alfalfa y remolacha azucarera) a través de ecuaciones que consideran el pH, el contenido de ácidos orgánicos y alcoholes de bajo peso molecular y de ácido láctico (Weissbach, 2011, Weissbach and Strubelt, 2008, Weißbach and Strubelt, 2008a, Weißbach and Strubelt, 2008b). Con temperaturas de 103°C-105°C, la pérdida de materia orgánica por volatilización es generalmente escasa, aunque sí puede influir de manera significativa en la sobreestimación del rendimiento de metano (Kreuger et al., 2011, Angelidaki et al., 2009). Kreuger et al. (2011) obtuvo rendimientos superiores en 8 y 39% cuando los ST y SV no fueron corregidos para el ensilado de maíz y hojas de remolacha, respectivamente. Angelidaki et al. (2009) recomienda para materiales con alto contenido en AGV incrementar el pH para decrecer su volatilidad durante la determinación de ST o trabajar a 90°C.

Al someter el residuo obtenido en el análisis de ST a ignición hasta peso constante a 550°C, se oxidan los componentes orgánicos y se obtiene una fracción inerte que recibe el nombre de cenizas. En las muestras lignocelulósicas hay dos tipos de ceniza: no extraíbles y extraíbles. Las no extraíbles son los materiales inorgánicos enlazados a la estructura y las extraíbles son los que se adhieren a la biomasa y se pueden eliminar por lavado con agua, la forma típica de cenizas extraíbles es el suelo (Sluiter et al., 2005a). En lignocelulosas con un alto contenido de cenizas (superior al 10 %), el método de análisis de lignina y carbohidratos fibrosos propuesto por Sluiter et al. (2008) no es adecuado, pues pueden neutralizar una parte del ácido sulfúrico y afectar considerablemente los resultados analíticos.

Al sustraer la masa de la fracción inerte de la masa inicial se obtiene el contenido de sólidos volátiles (SV) (2018d), que representa una aproximación de la fracción orgánica presente en el sustrato (Weinrich, 2018).

1.5)2. Extracción de cera.

La cera de la caña de azúcar se encuentra en forma de capas delgadas acumuladas en la superficie de la caña, y durante el proceso de molido una gran porción es separada del bagazo, se mezcla con el jugo y se deposita en la cachaza (Qi et al., 2017, Azzam and Ebrahim, 1986). Esta cera cruda está compuesta por tres fracciones: cera dura, aceite y resina (Muñoz Solares, 2019), aunque su composición varía según el método de extracción utilizado (Qi et al., 2017). Sus principales componentes son ésteres, aldehídos, alcoholes (policosanol) y ácidos grasos de cadena larga (Chakhathanbordee et al., 2016); también, en menor medida, alcanos de cadena larga, alquenos, hidrocarburos aromáticos y cetonas (Asikin et al., 2012).

La cera contenida en la caña de azúcar actúa como mecanismo de defensa e intercambio con el medio al impedir la evaporación del agua en la planta y el ataque de microorganismos (Taupier and Bugallo, 2000). Un contenido de lípidos superior al 10 % representa una interferencia en la determinación de carbohidratos fibrosos propuesto por Van Soest et al. (1991) ya que los detergentes son más solubles en la fase lípida que en la fase acuosa.

Se han desarrollado varias formas de extracción de cera a partir de diversos materiales como paja de triticale, paja de trigo, y también en subproductos de la industria azucarera, entre ellos la cachaza (Tabla 5). Utilizando etanol como solvente para su extracción se obtiene el producto de color verde y con temperatura de fusión, índices de acidez, saponificación y yodo en el intervalo reportado para las ceras comerciales de origen vegetal (Bhosale et al., 2012).

Tabla 5. Diferentes métodos de extracción de cera.

Material	Método de extracción	Solvente	Condiciones	Rendimiento (% de cera en el material)	Fuente
Corteza de la caña de azúcar	Soxhlet	CCl ₄	8-10 horas	0,95	(Inarkar and Lele, 2012)
Cachaza	Soxhlet	Tolueno	4-6 horas	5,4-5,6	(Bhosale et al., 2012)
		Benceno		6,9-7,4	
Cachaza	Lixiviación	n-heptano	87-98°C, 400 rpm, 30-60 min	5-6	(Chaviano et al., 2000)
Cutícula de caña de azúcar	Soxhlet	Éter de petróleo	Temperatura en el rango de ebullición de cada solvente, 4 horas	4,71	(García et al., 2003)
		Tricloroeteno		4,18	
		Tolueno		3,73	
Cachaza	Lixiviación	Etanol 96°GL	70°C, 700 rpm, 2 h y 30 min	8,54	(San Anastacio-Rebollar et al., 2017)
Cachaza	Soxhlet	n-hexano	80°C, 8 h	9,03	(Chakhath anbordee et al., 2016)
	Extracción con solvente acelerado	Etanol 95 %	100°C	13,32	
	Extracción con fluido supercrítico con codisolvente	CO ₂ y etanol comercial al 10 %	80°C, 200 bar	5,46	
Bagazo	Soxhlet	Mezcla de éter de petróleo y etanol (1:1)	75°C, 4 h	1,2	(Qi et al., 2017)

La digestibilidad de la celulosa y xilanos ha sido estudiada en bagazo de caña de azúcar nativo y sin cera, siendo de 18,7 % y 10,3 % para el bagazo sin cera; y de 13,1 % y 8,9 % para el nativo, respectivamente. Es decir, más polisacáridos fueron convertidos a azúcares solubles después de la extracción, por lo que se puede afirmar que el bagazo es más sensible a las enzimas después

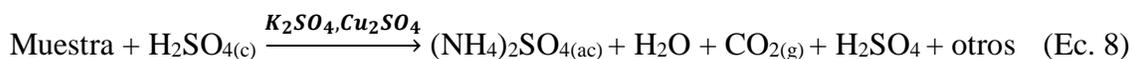
de la remoción de las capas externas de material ceroso (Qi et al., 2017). Esto sugiere que luego de una etapa de extracción de cera es de esperar un incremento en la solubilización de la DQO, y en función de los compuestos solubilizados y su concentración en el medio, un incremento en el rendimiento de metano.

1.5)3. Determinación de proteínas.

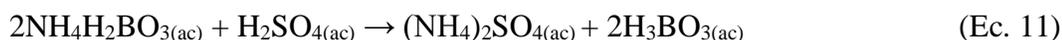
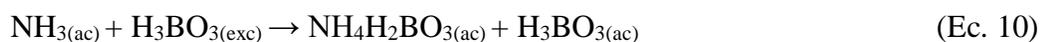
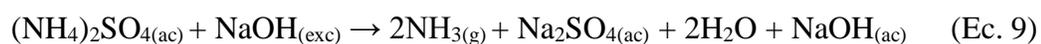
Las proteínas constituyen una interferencia en la determinación de lignina; por lo tanto, para su determinación exacta en los materiales lignocelulósicos con cantidades considerables de proteínas, su cuantificación es esencial (Hames et al., 2008). En el método presentado por Sluiter et al. (2008), las proteínas no hidrolizadas dan lugar a una sobreestimación de la lignina. Estas pueden determinarse simplemente mediante la medición del contenido de nitrógeno (por ejemplo, por el método Kjeldahl) y luego se estima el contenido de proteína utilizando un Factor Nitrógeno apropiado (factor N) (Karimi and Taherzadeh, 2016). Se han publicado varios métodos que recomiendan el uso de un factor de 6,25 para todo tipo de biomasa, excepto en granos de trigo donde se recomienda un factor de 5,7 (Hames et al., 2008).

El nitrógeno determinado por este método es la suma de nitrógeno orgánico e inorgánico. En presencia de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), sulfato de potasio (K_2SO_4) y sulfato de cobre (II) (Cu_2SO_4) como catalizador, el nitrógeno de los grupos amino de muchas sustancias orgánicas y el amoníaco libre, se convierte en iones amonio (NH_4^+) (2018b). La muestra se mezcla con H_2SO_4 a $350^{\circ}C$ - $380^{\circ}C$. Cuánto más alta sea la temperatura, más rápido será el proceso de digestión, de ahí que se añada K_2SO_4 para aumentar el punto de ebullición del H_2SO_4 y la eficiencia del procedimiento de digestión. El carbono orgánico y el hidrógeno de la biomasa

forman CO₂ y agua (Ec. 8). En este proceso la materia orgánica se carboniza dando lugar a la formación de una espuma negra (Chromý et al., 2015).



En presencia de una base (NaOH), el NH₄⁺ formado se transforma en amoníaco (NH₃) (Ec. 9), que puede ser destilado del medio alcalino y colectado en ácido bórico (2-4 %), sulfúrico (H₂SO₄ 0,04 mol/L) o clorhídrico (Ec. 10) para su posterior determinación que puede ser por valoración con un standard ácido mineral (Ec. 11) (2018b).



1.5)4. Determinación de carbohidratos no estructurales.

Dos tipos de carbohidratos pueden estar disponibles en la biomasa: estructural y no estructural. Los carbohidratos que están unidos en la biomasa se llaman estructurales, y los que se pueden eliminar por extracción o lavado se llaman no estructurales (Yu et al., 2011). El método de Sluiter et al. (2008) es adecuado para carbohidratos estructurales, pero no para los no estructurales. Por ejemplo, cuando el sorgo o caña de azúcar, con un poco de azúcar residual, se somete al análisis, los azúcares libres deben primero ser analizados y removidos.

Se han utilizado varios métodos para el análisis de monosacáridos y carbohidratos: refractometría, colorimetría, metanólisis, cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), cromatografía gas-líquido (GLC), cromatografía de intercambio aniónico (AEC), cromatografía de intercambio aniónico de alto pH con detección de pulso amperométrico (HPAE/PAD), espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica

(RMN-¹H), de infrarrojo cercano (NIR), análisis termogravimétrico (TGA), y electroforesis capilar (CE) (Tabla 6) (Karimi and Taherzadeh, 2016).

Tabla 6. Principales métodos utilizados en el análisis de azúcares. Fuente:

Método	Ventajas	Desventajas
GC	Utilizado en el análisis de azúcares traza.	Los azúcares deben ser derivatizados para hacerlos volátiles.
RMN	Método confiable.	Costo elevado, no es utilizado comúnmente en el análisis de biomásas lignocelulósicas y materiales pretratados.
HPLC	Ampliamente utilizado en el análisis de biomásas lignocelulósicas.	No existe una única columna HPLC para detectar todos los azúcares. Un material de intercambio-ácido fuerte es adecuado para monosacáridos, etanol, butanol, glicerol, furfural, HMF, ácido acético pero no para oligosacáridos.
AEC	Alta resolución y selectividad.	La columna presenta problemas con los sulfatos y los bajos pH.
HPAE/PAD	Muy alta resolución.	El detector es muy sensible por lo que la muestra hidrolizada debe ser diluida 50 a 100 veces, lo cual introduce un error.
Refractometría	Constituye una aproximación de los azúcares puros.	Elevada interferencia con otros químicos, incluso minerales.
Colorimetría	Simple y rápido.	No puede diferenciar entre los tipos de monosacáridos.

El método de fenol-ácido sulfúrico o de Dubois ha sido uno de los métodos más utilizados para la determinación de carbohidratos totales por espectrofotometría (Avila Núñez et al., 2012). Se basa en la deshidratación de los azúcares por acción de H₂SO₄ para formar furfural y (HMF), que posteriormente reaccionan con el fenol para formar un compuesto coloreado que permite la cuantificación por espectrofotometría UV-Visible a una longitud de onda de 490 nm (Fig. 6 y 7). Constituye un método sensible y ofrece resultados reproducibles (DuBois et al., 1956), aunque investigaciones recientes han demostrado que no es necesario el uso del fenol, sino solo la hidrólisis con H₂SO₄ concentrado y la medición a 315 nm (López-Legarda et al., 2017).

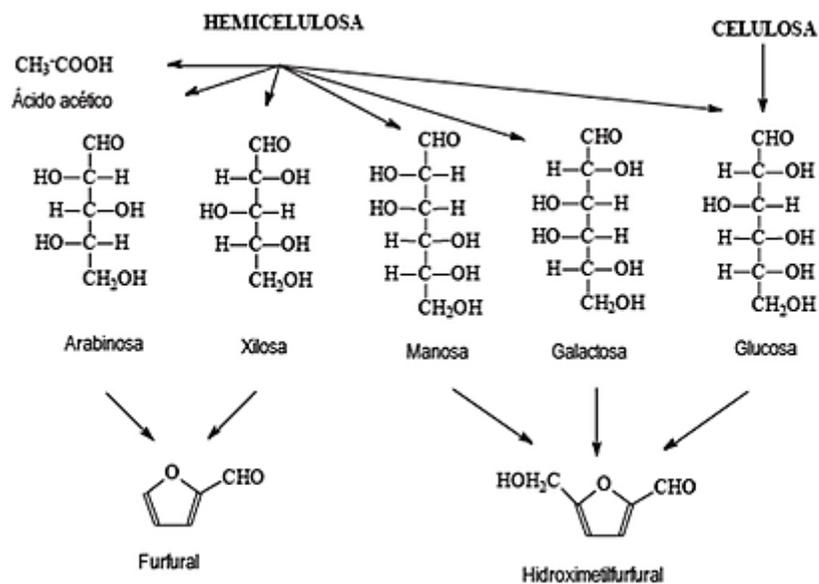


Fig. 6: Modelo de formación de compuestos inhibidores de la fermentación. Fuente: (Mateus et al., 2012).

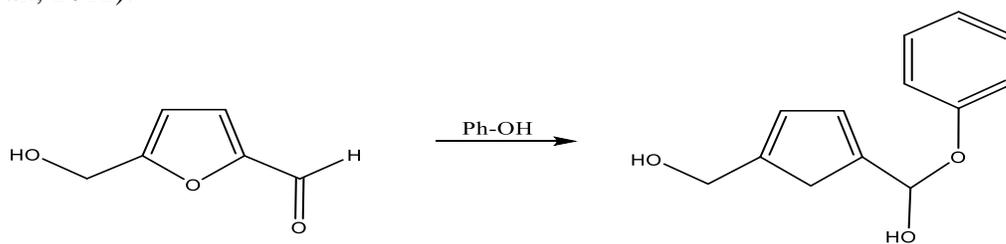


Fig. 7: Método PSA. Fuente: (DuBois et al., 1956).

El método de Miller es uno de los más empleados en la determinación de azúcares reductores debido a su bajo costo, baja toxicidad de los reactivos, alta sensibilidad y productividad, por lo que ha sufrido varias modificaciones a través de los años para adecuarse al análisis de diferentes materiales (Avila Núñez et al., 2012, Gil et al., 2006, Ortiz et al., 2015). Se basa en la reacción de los grupos reductores de los azúcares con el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). El reactivo consiste en una disolución formada por ácido 3,5-dinitrosalicílico (ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzoico), que actúa como oxidante; sal de Rochelle (tartrato de sodio-potasio), que impide la disolución de oxígeno en el reactivo, y NaOH, que aporta el medio requerido para la reacción redox. El DNS se reduce formando el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, mientras que el

grupo aldehído se oxida para formar un grupo carboxilo. La lectura para la cuantificación se realiza a una longitud de onda de 540 nm. La presencia de azúcares reductores se puede evidenciar por el cambio de color amarillo a naranja o a rojo ladrillo (Fig. 8). La intensidad del color está relacionada con la concentración de azúcares reductores en la muestra (Tena and Jorin, 2010). De forma general, los métodos cromatográficos son los más utilizados para la detección y cuantificación de azúcares y sus productos de degradación en el análisis de biomasa lignocelulósicas, pero son muy costosos y trabajosos por lo que en muchos laboratorios se continúa empleando la espectrofotometría con este fin.

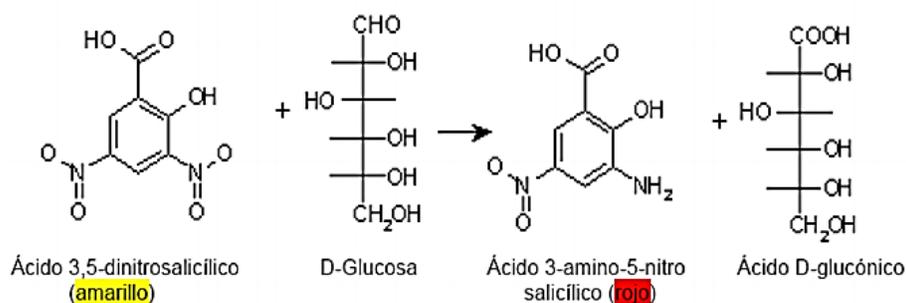


Fig. 8: Reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico. Fuente: (Tena and Jorin, 2010).

La cuantificación de los azúcares no reductores se puede determinar por diferencia entre los azúcares totales y los azúcares reductores (Avila Núñez et al., 2012).

1.5)5. Determinación de carbohidratos fibrosos.

Varios investigadores han desarrollado aproximaciones para estimar la composición nutricional de diferentes sustratos, la cual influye en la digestibilidad de las muestras. La determinación analítica se basa típicamente en el análisis proximal (método Weende) y el método de los detergentes de Van Soest (Fig. 9) (Weinrich, 2018).

El sistema de análisis de Weende es un método gravimétrico que consiste en colocar una muestra secuencialmente en reflujo en base diluida (NaOH), seguido por ácido diluido (H₂SO₄). El

residuo resultante se conoce originalmente como la porción indigerible del forraje o fibra cruda (FC), que actualmente se sabe que está compuesto principalmente por celulosa y proporciones variables de polisacáridos no celulósicos y de lignina. Según Weende, la FC representaba la fracción menos digerible de los alimentos, y el extracto libre de nitrógeno la de los carbohidratos más digeribles, lo cual conducía a resultados erróneos (Segura et al., 2007).

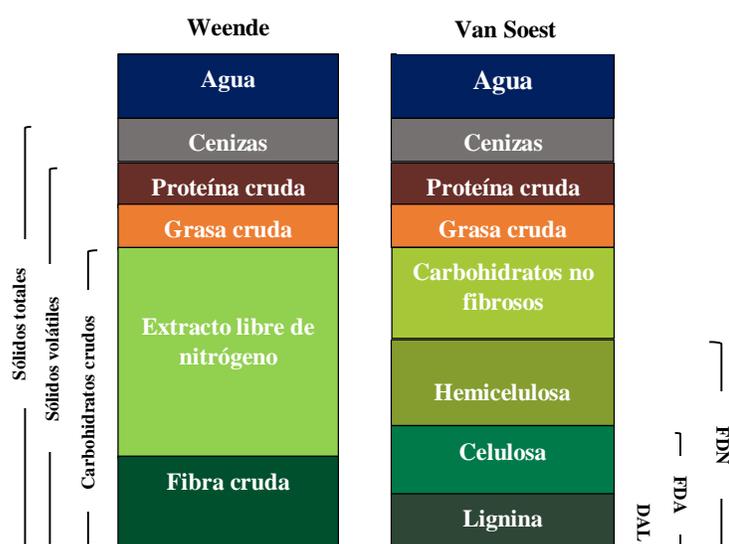


Fig. 9: Componentes del análisis de Weende y Van Soest de nutrientes característicos. Fuente: (Weinrich, 2018).

La propuesta de Van Soest se basó en el uso de detergentes, debido a la capacidad que tienen algunos detergentes aniónicos (como el laurilsulfato de sodio) de solubilizar proteínas, así como de la propiedad que poseen algunos compuestos de amonio cuaternario (bromuro de cetiltrimetilamonio) para disolver polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Según él, el uso de estos compuestos serviría para fraccionar adecuadamente la fibra conservando la lignina. Van Soest declaró que de la fibra detergente neutro (FDN) hacen parte la hemicelulosa, celulosa, lignina y otros componentes (combinaciones de nitrógeno con hemicelulosas y lignina con celulosa, cutina, taninos, proteína, queratina y sílice). Para la fibra detergente ácido (FDA) sus

principales constituyentes serían los mismos que los de la FDN, excepto la hemicelulosa (Van Soest 1994). Este método sigue siendo utilizado para el análisis de compuestos lignocelulósicos (Fig. 10) (González et al., 2013), aunque se deben tener en cuenta varios aspectos para llevar a cabo el análisis (Tabla 7) (Van Soest et al., 1991).

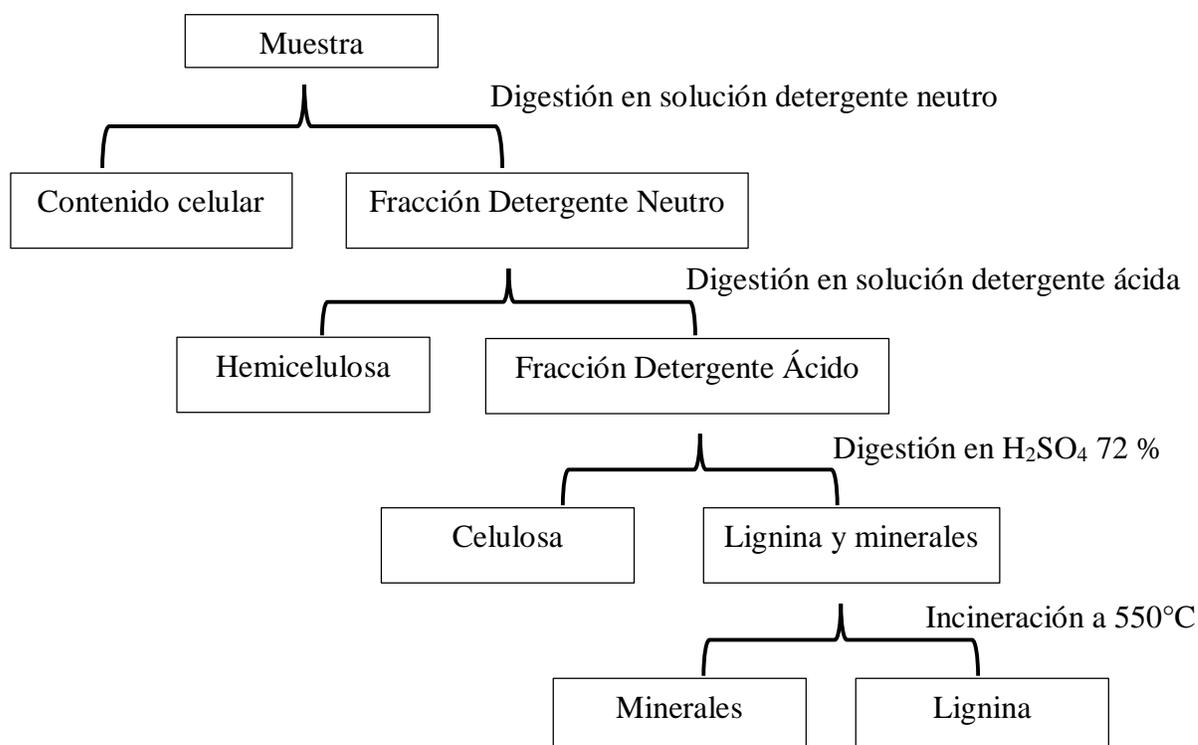


Fig. 10: Fraccionamiento de la pared celular. Fuente: (Van Soest and Robertson, 1985).

Sluiter et al. (2008) propone otra vía para la cuantificación de carbohidratos estructurales y lignina, basada en una hidrólisis ácida de dos etapas. La biomasa se somete en primer lugar a hidrólisis con H_2SO_4 al 72 %, seguido de dilución de la mezcla para obtener hidrólisis con H_2SO_4 al 4 % a $120^\circ C$ en un recipiente sellado. Después la mezcla se neutraliza por encalado, y los azúcares simples y los grupos acetilo liberados son determinados por HPLC. En este método, la lignina se clasifica como fracciones insoluble en ácido (AIL) y soluble en ácido

(ASL). El material soluble en ácido es la fracción de lignina que tiene un peso molecular bajo y se solubiliza en la hidrólisis ácida. Se determina utilizando espectrofotometría UV-Visible. La lignina insoluble en ácido, por otra parte, es la de peso molecular elevado que no puede ser disuelta durante la hidrólisis y se mide gravimétricamente. Este tipo de lignina se determina por la filtración de los materiales después de la hidrólisis ácida, secado a 105°C, y calcinado a 575°C (Sluiter et al., 2008). Este método es sencillo; sin embargo, se debe prestar especial atención para obtener resultados confiables (Tabla 7) (Sluiter et al., 2010, Templeton et al., 2010).

Tabla 7. Ventajas y desventajas de los diferentes tipos de análisis de fibra. Fuente: (Van Soest et al., 1991, Sluiter et al., 2008, Jaimes et al., 2018, Weinrich, 2018).

Método	Ventajas	Desventajas	Consideraciones
Weende	Análisis simple, no requiere de equipamiento sofisticado.	Se remueven polisacáridos no celulósicos y lignina, se elimina hemicelulosa, se subestima el contenido total de la pared celular y se recupera sólo una porción de los polisacáridos y la lignina.	
Van Soest	Método de análisis simple. No requiere de equipamiento especial.	Sobreestima el contenido de celulosa y hemicelulosa por la posible presencia de proteínas en la FDN y la pérdida de lignina en la FDA.	Uso de sulfito de sodio para disminuir los niveles de proteína en el análisis de FDN, pero no debe ser utilizado en análisis secuenciales que impliquen la determinación de lignina. En estos casos debe cuantificarse las proteínas. Un contenido de lípidos superior al 10 % interfiere ya que los detergentes son más solubles en ellos que en agua. Uso de α -amilasa para degradar el almidón, aunque esta enzima puede presentar actividad hacia otros carbohidratos, por lo que también se puede utilizar 2-etoxietanol o trietilenglicol a igual concentración.

Técnica propuesta por Sluiter	Método sencillo	Requiere de equipamiento especial (HPLC).	Secar las muestras antes del análisis, (la humedad diluye el ácido añadido). El muestreo, tamaño de partícula, impurezas tales como proteínas, almidón, suelo, u otros residuos puede afectar altamente los resultados.
-------------------------------	-----------------	-------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

1.6) Caracterización físico-química de la biomasa lignocelulósica después del pretratamiento.

1.6.1. Separación de las fracciones líquida y sólida.

Después del pretratamiento las fracciones sólida (FS) y líquida (FL) deben ser separadas para los análisis posteriores, por filtración a vacío o por centrifugación. La FS ya separada debe ser lavada con agua o pequeñas cantidades de detergente, y volverse a filtrar (Burkhardt et al., 2013); y luego se realiza el secado (Hames, 2009).

1.6.2. Separación de los extractivos en fracción sólida.

Los extractivos son una mezcla de diferentes productos químicos: resinas, proteínas, fitosteroles, grasas, ceras, sales, los azúcares libres y una serie de hidrocarburos no volátiles en porciones menores. Estos compuestos interfieren en el análisis de lignina, por lo que deben extraerse primero para obtener resultados aceptables. Como ejemplo, la corteza de un pinar, que contiene 19 % de extractivos, se analizó utilizando el método de Sluiter et al. (2005b), con y sin la separación de extractivos (Burkhardt et al., 2013). El contenido de lignina fue de 52,7 % cuando los extractivos no se separaron, y de 34,5 % cuando se realizó la extracción previa, lo cual se traduce como una sobreestimación de más del 50 % (material 6, tabla 8).

Tabla 8. Influencia de un paso de extracción en el contenido de lignina de la biomasa original (expresado como % en base seca). Fuente: adaptado de Burkhardt et al. (2013).

Material sometido a extracción	Contenido de extractivos		Contenido de lignina insoluble en ácido		
	Agua	Agua+etanol	Sin extracción	Al incluir extracción con agua	Al incluir extracción con agua y etanol
1	2,6	3,8	28,2	25,0	24,9
2	4,1	6,3	33,3	26,7	23,5
3	5,2	9,4	38,6	28,2	25,8
4	3,6	6,2	42,8	39,8	36,1
5	3,5	5,7	39,7	35,4	33,8
6	13,6	19,0	52,7	39,4	34,5

Un método simple y estandarizado, sugerido para la determinación de extractivos en ASTM E1690 y modificado por Sluiter et al. (2005b), se utiliza ampliamente para el análisis de materiales pretratados para biocombustible. De acuerdo con este método, los extractivos son simplemente extraídos en un extractor Soxhlet por agua o un disolvente, generalmente etanol. Los materiales inorgánicos y nitrogenados, como ácidos de azúcares y azúcares no estructurales pueden ser extraídos por el agua, mientras que materiales cerosos y aceitosos pueden ser extraídos por etanol (Sluiter et al., 2005b).

Otra de las sustancias que interfiere en el análisis de compuestos lignocelulósicos es el almidón, que se hidroliza a glucosa en condiciones menos severas que la celulosa. Bajo las condiciones de hidrólisis presentadas por Sluiter et al. (2008), el almidón se convierte en glucosa, pero una parte de esta se descompone en otros productos, como el HMF, por lo que se requiere una hidrólisis separada para el análisis de almidón, que puede ser por vía enzimática con α -amilasa (Moore et al., 2015); luego, el contenido de almidón puede ser restado del total de glucanos.

1.6)3. Determinación de pH.

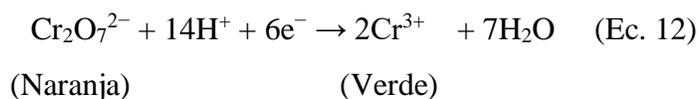
La variación en el pH provoca cambio de los grupos hidrolizables de las enzimas (carboxilo y amino) y alteración de los compuestos no enzimáticos del sistema (ionización del sustrato, desnaturalización de la estructura proteica de la enzima), lo cual influye sobre las reacciones químicas y bioquímicas que tienen lugar (Lorenzo and Abreu, 2005), por lo que su valor en la muestra que se somete a DA deben encontrarse en el rango de 6 a 8,3 (Zohorović et al., 2016).

1.6)4. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno Soluble.

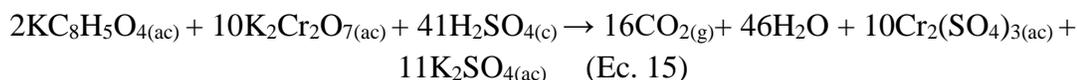
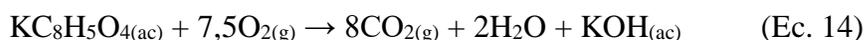
La DQO se define como la cantidad de un oxidante específico que reacciona con la muestra en condiciones controladas. Los componentes orgánicos e inorgánicos de una muestra están sujetos a oxidación, pero en la mayoría de los casos predomina el componente orgánico (2018c). Cuando se realiza algún pretratamiento, se determina la DQO soluble (DQOs), que se corresponde con el valor de DQO de la FL, para evaluar su efecto en la solubilización de la materia orgánica. Su determinación se puede realizar por vía volumétrica o colorimétrica.

Ambos métodos se basan en la reacción de una cantidad de muestra con un oxidante energético, como es el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), en medio ácido sulfúrico con el ion plata (Ag^+) como catalizador (2018c). En el caso de la volumetría, luego de que la mezcla es reflujada en H_2SO_4 con un exceso conocido de $K_2Cr_2O_7$, el exceso de dicromato no reducido es valorado con sulfato de amonio ferroso ($Fe(NH_4)_2SO_4$ o FAS), en presencia de ferroína como indicador, para determinar la cantidad de $K_2Cr_2O_7$ consumido, y la materia oxidable se calcula en términos de equivalente de oxígeno. El tiempo standard de reflujo es de dos horas aunque puede ser reducido.

En el caso del ion dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), se produce la reducción al ion Cr^{3+} y a partir del análisis de las reacciones de redox (Ec. 12 y 13), se obtiene que el consumo de 1 mol de $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ es equivalente al de 1,5 moles de O_2 (2018c).



Para comprobar la técnica y la pureza de los reactivos se realiza el ensayo testigo a partir de estándares de control de diferentes concentraciones de hidrogenofalato de potasio (HFP). El HFP tiene una DQO teórica de 1,176 mgO_2/mg y una solución patrón de concentración másica 0,425 g/L tiene una DQO teórica de 500 mgO_2/L (Ec. 14 y 15). El procedimiento es satisfactorio si se obtiene como mínimo el 96 % del valor teórico (2018c).



Cuando la muestra es digerida se produce la reducción del Cr^{6+} del ion dicromato a Cr^{3+} , ambas especies coloreadas y absorben en la región visible del espectro. El ion dicromato (amarillo) absorbe fuertemente a 400 nm, mientras que el cromo (III) (verde), en la región de los 600 nm, donde el dicromato tiene absorción casi nula (2018c). Para valores de DQO entre los 100 y 900 mg/L , se determina el incremento en Cr^{3+} a 600 nm y valores más altos pueden ser obtenidos por una simple dilución (2018c).

1.6)5. Determinación de ácidos grasos volátiles.

Los AGV, principalmente el ácido acético, pueden estar contenidos en la biomasa sin pretratar aunque también son subproducto de algunos pretratamientos, como en el pretratamiento por

agua caliente presurizada. Aquí el ácido acético obtenido por la hidrólisis del grupo O-acetil contenido en la hemicelulosa, genera iones H^+ , que incrementan la eficacia del pretratamiento solubilizando prácticamente toda la hemicelulosa y parte de la lignina (Garrote et al., 1999).

En pretratamiento de cachaza con NaOH, Janke et al. (2016) encontró como AGV mayoritarios los ácidos acético y butírico. Durante el pretratamiento termoalcalino de la cachaza con $Ca(OH)_2$ realizado por López González (2016), el ácido acético fue el único identificado y su concentración se incrementó rápidamente con el aumento de la CA de 7 a 11,24 %. Su generación depende principalmente de la temperatura, CA y el tiempo de pretratamiento hasta que los grupos acetilo son completamente hidrolizados en la hemicelulosa.

Existen diversos métodos para la determinación de AGV: destilación, espectrofotometría, GC, HPLC (Mkhize et al., 2014, Chatterjee et al., 2018) y la valoración potenciométrica por determinación de alcalinidad (Liebetrau et al., 2016, Frost and Scholes, 2013).

La alcalinidad total es la capacidad del agua para neutralizar ácidos, debido a la presencia de sustancias como bicarbonato, carbonato e hidróxido, amoníaco, borato, fosfato, silicato y los aniones orgánicos que también pueden incluirse. Es aproximadamente equivalente a la concentración del anión bicarbonato para sustratos que tengan baja la concentración de AGV. Sin embargo, cuando la concentración de AGV se incrementa, éstos son neutralizados por la alcalinidad al bicarbonato y la alcalinidad total está compuesta por ambas, o sea, al bicarbonato y a los AGV. La muestra se valora con una solución de ácido normalizada hasta $pH=5$ y $pH=4,4$, de acuerdo al método de FAL, y para $pH=5$, $pH=4,3$, y $pH=4,0$, de acuerdo a Kapp (Liebetrau et al., 2016). Estos puntos finales se utilizan en la determinación de la alcalinidad parcial (AP), debida a los bicarbonatos, y la intermedia (AI), que indica la concentración de AGV.

1.6)6. Determinación de productos de degradación de azúcares.

Producto de la degradación de pentosas y hexosas que conforman los azúcares se forma el furfural y el HMF, que afectan negativamente el proceso de DA (Fig. 11 y 12). Existen varios métodos para la determinación de ambos componentes: cromatografía de gases, HPLC y espectrofotometría. El más utilizado y más exacto es el de HPLC (Janke et al., 2019b, Huamán Castilla et al., 2017), pero la espectrofotometría constituye un método más sencillo, que conlleva equipos más simples y es mucho más rápido (Tabla 9).

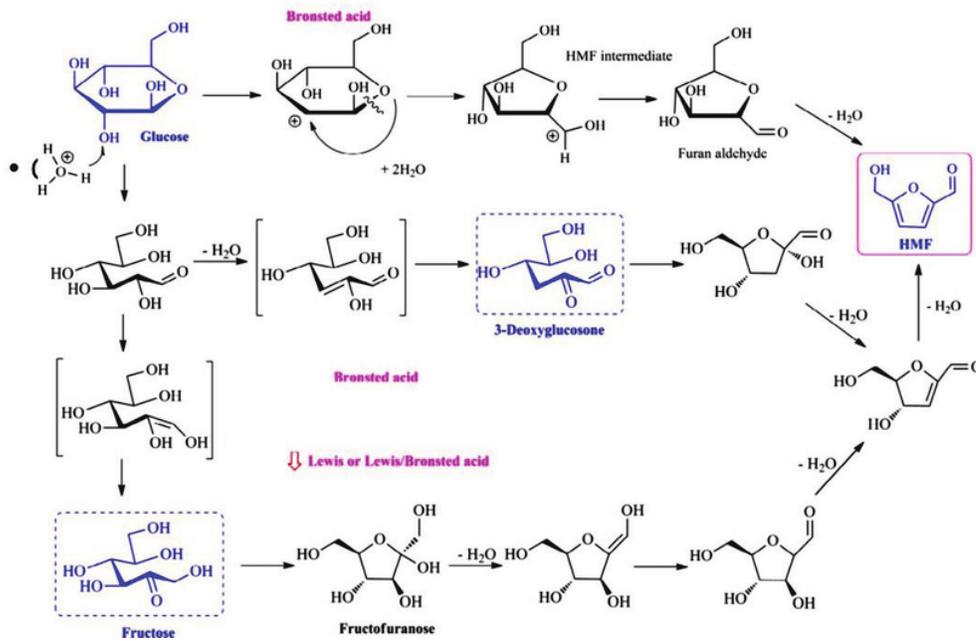


Fig. 11: Conversión de D-glucosa a HMF mediante ácidos Lewis y Brønsted. Fuente: (Li et al., 2016).

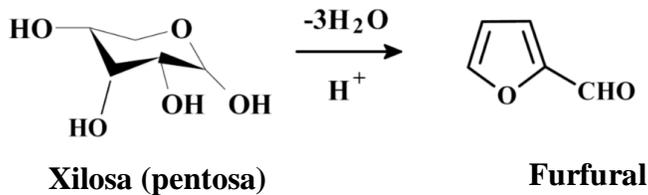


Fig. 12: Deshidratación por catálisis ácida de xilosa a furfural. Fuente: (Chen et al., 2013).

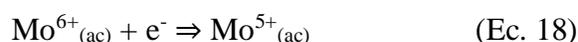
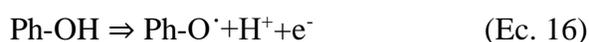
Tabla 9. Diferentes métodos espectrofotométricos para la cuantificación de furfural e HMF.

Compuesto	Muestra	Condiciones de reacción	Longitud de onda (nm)	Referencia
Furfural	Tequila	Con anilina, en presencia de ácido por 20 minutos a 20°C	520	(Pruebas Colorimétricas para Asegurar la Calidad del Tequila)
Furfural	Bebidas alcohólicas	Medición directa (dilución con alcohol)	277	(Norma Venezolana 1993).
Furfural	Agua	Con fenilhidracina en ácido hidrocórico, SDS y agua a 70°C por 10 min seguido de enfriamiento, adición de Triton X-100 y centrifugación. Se disuelve la fase detergente en etanol.	446	(Zarei, 2009)
Furfural HMF	Junco	Hidrólisis en solución etanol-agua (50 %) a 185°C y posterior destilación.	276,78 284,28	(Zhang et al., 2017)
Furfural HMF	Harina de madera	Con ácido sulfúrico, 185°C por 20 min; centrifugación y dilución de sobrenadante.	277 285	(Chi et al., 2009)
HMF	Sirope de maíz	Con hidrogenosulfito de sodio al 0,1 % (p/v).	285	(de Andrade et al., 2017)

1.6)7. Determinación de productos de solubilización de la lignina

Debido a la solubilización de la lignina se forman derivados fenólicos, entre ellos los ácidos ferúlico (ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenoico), p-cumárico (ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico), sirínquico (ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico), vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico) y gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) (Fig. 13 y 14) (López González et al., 2014), que constituyen un riesgo por su posible efecto inhibitorio en la DA, por lo que deben ser cuantificados. El método más utilizado con este fin en la evaluación de los pretratamientos a biomásas lignocelulósicas es el de HPLC, aunque existen otros métodos más

convencionales que resultan confiables, como el de Folin-Cicolteau (Hernández Gómez, 2019, Jurado Teixeira et al., 2016, Nossa González et al., 2016), basado en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Cicolteau (ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo) en medio básico para originar, por reducción, una mezcla de óxidos de color azul (Ec. 16-18) cuya absorbancia se mide a 765 nm (Hostalet et al., 2011, García Martínez et al., 2015).



Amarillo Azul

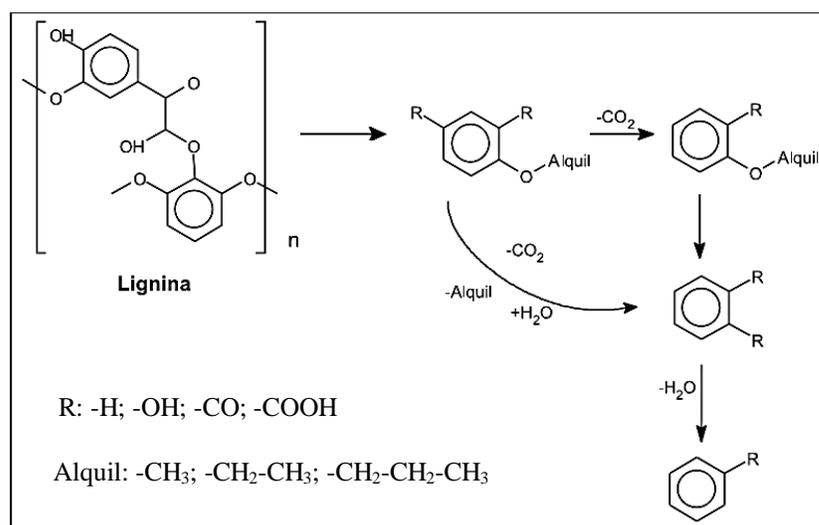


Fig. 13: Esquema de reacción generalizado para monómeros de lignina y derivados fenólicos. Fuente: (Castro Vega et al., 2007).

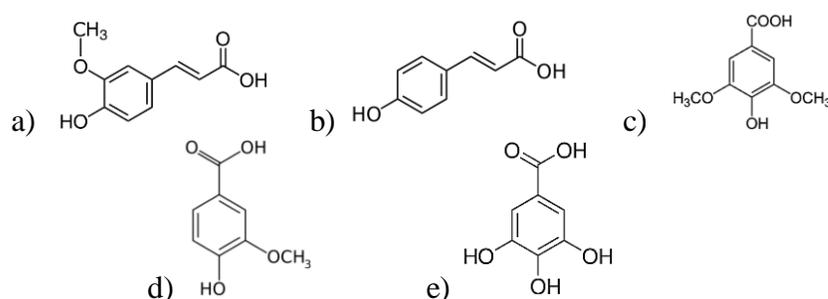


Fig. 14: Principales productos de solubilización de la lignina: a) ácido ferúlico; b) ácido cumárico; c) ácido sirínquico; d) ácido vanílico y e) ácido gálico.

1.6)8. Determinación cualitativa de cambios estructurales en la biomasa lignocelulósica.

Es necesario destacar que el análisis composicional no es suficiente para investigar los efectos de un pretratamiento sobre la biomasa lignocelulósica. Es decir, no es suficiente saber la cantidad de lignina que tiene una biomasa; sino también dónde se encuentra y la forma en que interactúa con la celulosa y la hemicelulosa. Su relocalización producto del pretratamiento es tan importante como su eliminación en la mejora de la hidrólisis de la biomasa.

Actualmente, la microscopía de escáner electrónico (SEM), la microscopía de transmisión electrónica (TEM) y la de fuerza atómica (AFM), son ampliamente utilizadas para investigar las estructuras de materiales lignocelulósicos a escalas nanométricas que no se pueden deducir por otros análisis (Fig. 15). Con ellas se pueden observar las microfibrillas y las paredes celulares. SEM y TEM pueden proporcionar imágenes bidimensionales, mientras que una alta resolución con imágenes tridimensionales puede ser obtenida por AFM sin la necesidad de preparar la muestra, teñirla, deshidratarla o cubrirla con algún metal para poner de relieve las estructuras de la pared celular y sus componentes (Sant'Anna and de Souza, 2012).

Otro factor importante es la cristalinidad de la celulosa. A diferencia del almidón y la hemicelulosa, esta tiene una estructura que juega un papel importante en la conversión biológica. Una evidencia de esto es la muy baja digestibilidad enzimática y microbiana de las fibras de algodón natural puro, en las que no está presente lignina ni hemicelulosa. La celulosa, por sí misma, consiste en regiones con un orden molecular bajo (regiones amorfas o celulosa), regiones con un orden cristalino muy alto (celulosa cristalina), y una pequeña cantidad de la materia con un orden intermedio (Ciolacu et al., 2011). Las regiones amorfas son capaces de adsorber el agua; además, su hidrólisis química, enzimática, y microbiana son más fáciles y más

rápidas que para las zonas cristalinas (Karimi et al., 2013, Kumar and Wyman, 2013). La celulosa amorfa se puede obtener de la celulosa cristalina por medio de los pretratamientos; sin embargo, en presencia de agua, la celulosa amorfa construida es termodinámicamente inestable y regresa en parte a su forma cristalina.

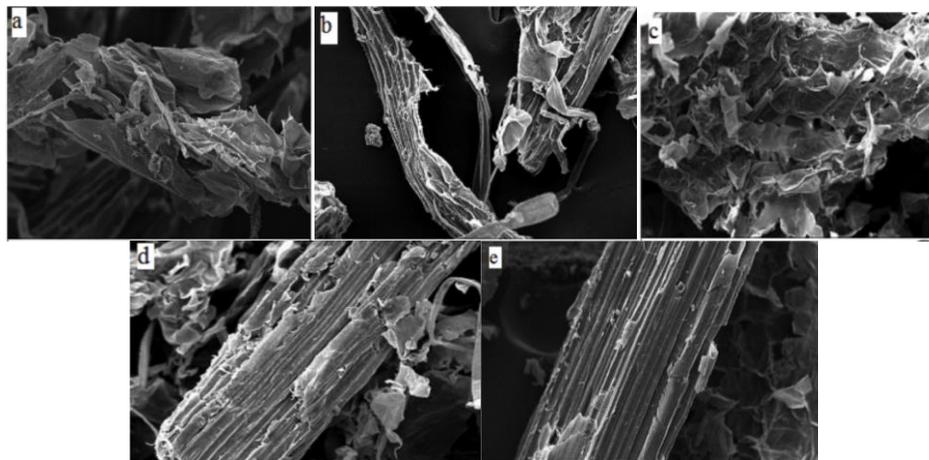


Fig. 15: Imágenes SEM de (a) Pretratamiento con carbonato de sodio a 180°C, (b) Pretratamiento con carbonato de sodio a 140°C, (c) Pretratamiento con sulfito de sodio a 140°C, (d) Pretratamiento con acetato de sodio a 180°C, y (e) Bagazo sin pretratar. Fuente: (Nosratpour et al., 2018)

Se ha informado en varias ocasiones que la “reducción de la cristalinidad” de la celulosa resulta en mayores velocidades de bioconversión (Ostovareh et al., 2015). Sin embargo, diversas investigaciones han demostrado que una mayor digestibilidad se puede obtener con mayor cristalinidad. En esos casos, otros factores, como el área superficial accesible, porosidad, contenido de lignina y hemicelulosa, y tamaño de partícula, fueron los de mayor influencia (Karimi and Taherzadeh, 2016). La cristalinidad puede ser analizada por difracción de rayos X (XRD), espectroscopía infrarroja a transformada de Fourier (FTIR) y la resonancia magnética nuclear (RMN). FTIR es un método adecuado para propósitos comparativos, mientras que los valores del índice de cristalinidad son más precisos por los análisis de XRD y de RMN (Karimi and Taherzadeh, 2016).

Capítulo II: Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describen algunos de los procedimientos necesarios para las determinaciones que se muestran en la tabla 10 del Capítulo III, que fueron aplicados a la cachaza con cera y que también deben ser aplicados a la cachaza sin cera y a la cachaza sin cera pretratada. Los resultados finales obtenidos en cada análisis se muestran en la tabla 11 del Capítulo III.

La cachaza empleada fue proporcionada por el Central “Melanio Hernández” perteneciente a la provincia Sancti-Spíritus, durante la zafra del 2020. Esta fue secada al sol durante tres días y almacenada en sacos a temperatura ambiente hasta su uso. Los reactivos utilizados fueron proporcionados por Merck.

2.1) Determinación de sólidos totales, volátiles y cenizas.

Equipos y materiales: Estufa eléctrica equipada con termostato (marca Thermo Scientific), mufla para trabajar a una temperatura de $550\pm 50^{\circ}\text{C}$ (marca Thermo Scientific), balanza analítica (Marca Sartorius), desecadora, guantes resistentes al calor, cápsulas de porcelana.

Procedimiento:

1. Las cápsulas se lavaron previamente con detergente y agua caliente y se enjuagaron con agua destilada, se colocaron vacías en la estufa a 110°C por una hora y posteriormente en la desecadora hasta su uso.
2. Se sacaron las cápsulas de la desecadora y se pesaron en la balanza analítica (pc). Luego se le añadieron muestras frescas de aproximadamente 4 g y se anotó el peso exacto ($p_{t_{inicial}}$).
3. Se colocaron las cápsulas con la muestra en la estufa a 110°C por 24 horas. Se sacaron y se enfriaron en la desecadora hasta temperatura ambiente por 1 hora. Se pesaron las cápsulas con las muestras secas ($p_{t_{final}}$).

4. Las cápsulas de porcelana con el residuo seco de las muestras se colocaron en la mufla, que se encendió y se verificó el aumento gradual de la temperatura hasta 550°C, la cual se mantuvo por cuatro horas. Se sacaron las cápsulas de la mufla y se enfriaron en la desecadora hasta temperatura ambiente, por 2 horas, se pesaron y se anotaron los valores ($p_{t_{\text{final-550}^{\circ}\text{C}}}$).

La expresión para el cálculo de ST, SV y cenizas aparece en el Anexo I y la tabla con los resultados en el Anexo II.

2.2) Determinación de pH

Para la determinación de pH se utilizó una muestra de 5 g de cachaza diluida en 50 mL de agua destilada.

Equipos y materiales: Balanza analítica (marca Sartorius), pH-metro (marca Thermo Scientific), agitador magnético (IKA[®] RH basic 2), matraces aforados (100 mL, 500 mL, 1000 mL), beaker (50 ml).

Disoluciones empleadas: Disoluciones tampón de pH 4, pH 7 y pH 9, cloruro de potasio (KCl) 3 mol/L. En caso de no contarse con las soluciones tampón certificadas se pueden preparar de la forma descrita en el Anexo III.

Procedimiento:

Se encendió y se calibró el equipo utilizando las soluciones tampón. Se lavaron y secaron los electrodos y se enjuagaron con la solución problema antes de realizar la lectura. Las soluciones buffer y las soluciones problemas se agitaron cuidadosamente durante la medición. Se esperaron cinco minutos hasta que la lectura se estabilizara y se realizó la lectura final. Se lavaron los

electrodos con abundante agua destilada y se dejaron sumergidos en una solución de KCl hasta su posterior uso.

2.3) Determinación de la DQO soluble.

Equipos y materiales: Bloque de calentamiento (marca HACH), balanza analítica (marca Sartorius), espectrofotómetro UV-Vis (marca Rayleigh UV-1800), centrífuga de seis plazas (marca NAHITA®), tubos de digestión, guantes resistentes al calor, desecadora, matraces aforados (50, 100 y 1000 mL), erlenmeyer (50 o 100 mL), probetas (50 o 100 mL), pipeta graduada (5 mL), pipetas aforadas (5, 10, 20 y 25 mL), bureta (25 mL), beaker (500 mL).

Disoluciones empleadas: dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) 0,0042 mol/L, 0,0167 mol/L y 0,0417 mol/L en agua y H_2SO_4 (agente oxidante), sulfato de hierro amoniacal hexahidratado ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \times 6H_2O$) 0,04 mol/L y 0,1 mol/L, solución de sulfato de plata (Ag_2SO_4) en H_2SO_4 (agente ácido) (0,032 mol/L), solución indicadora de ferroína, estándar de HFP 0,00235 mol/L, agua destilada. La preparación de las disoluciones se describe en el Anexo IV.

Procedimiento:

1. Antes de realizar el análisis se deben diluir las muestras, en el caso de la cachaza con cera y sin cera se diluye primero el material (1 g por cada 10 mL de agua), se centrifuga a 6500 rpm por 30 min, y luego se diluye la fracción líquida a razón de 1/100. En el caso de las muestras pretratadas se debe realizar una dilución de 1/200.
2. Los tubos de digestión deben ser previamente lavados con H_2SO_4 al 20 % para prevenir contaminación. Se preparan para cada corrida dos blancos (agua destilada). Uno de ellos es un blanco frío (no se pone en el bloque de reacción) y se utiliza para estandarizar al FAS. El blanco caliente se somete a las mismas condiciones que la muestra.

3. A partir de la solución patrón de HFP (DQO 500 mgO₂/L), se preparan 50 mL de estándares de 50, 100, 200 mgO₂/L y 5,0 mgO₂/L. Cuando se pase un lote de muestras se incluyen estándares de 50 y 200 mgO₂/L, para muestras que se procesen con K₂Cr₂O₇ 0,0167 mol/L; estándares de 100 y 500 mgO₂/L, para las procesadas con K₂Cr₂O₇ 0,0417 mol/L y estándares 5,0 mgO₂/L, para las procesadas con K₂Cr₂O₇ 0,0042 mol/L.
4. Para las muestras, blancos y testigos: se añaden 2,5 mL (por duplicado) en los tubos de digestión. Se adicionan 1,50 mL de la solución oxidante y 3,5 mL del agente ácido deslizándose cuidadosamente por las paredes del vial (que debe estar sumergido en un beaker con agua helada). Se cierran herméticamente los frascos y se colocan los tubos en el digestor precalentado a 150°C. Se inicia el proceso de digestión durante 2 horas.
5. Se sacan los frascos cuidadosamente y se dejan enfriar a temperatura ambiente. En todos los pasos descritos hasta el momento deben tenerse en cuenta algunas precauciones las cuales se muestran en el Anexo V.
6. Determinación por vía volumétrica: Se transfiere el contenido a un erlenmeyer e igual volumen (7,5 mL) de agua destilada. Se añaden 2 o 3 gotas de indicador. Se valora con la solución de FAS 0,04 mol/L (si usó dicromato 0,0042 o 0,0167 mol/L) o FAS 0,10 mol/L (si usó dicromato 0,0417 mol/L), hasta cambio de color de verde-azul a rojo ladrillo. El cálculo de DQO se realiza según las expresiones que se muestran en el Anexo VI.
7. Determinación por vía colorimétrica: Una vez que los tubos alcanzan la temperatura ambiente se realiza la medición de absorbancia a 600 nm. Se elabora una curva de calibración a partir de estándares de HFP de DQO de 50, 100, 150, 200 y 250 mgO₂/L.

2.4) Determinación de alcalinidad.

Equipos y materiales: Agitador magnético (IKA® RH basic 2), pH-metro (marca Thermo Scientific), bureta graduada (25 o 50 ml), beaker (50 o 250 mL).

Disoluciones empleadas: estándares de pH 4,0 y 7,0, ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,1 mol/L. Su preparación se describe en el Anexo VII.

Procedimiento:

1. Se enciende y se calibra el equipo empleando las soluciones tampón.
2. Se añaden 20 mL de cada muestra (fracción líquida) a un beaker de 50 mL. Se valoran primero hasta pH 5 para determinar la alcalinidad parcial (AP) (se anota el consumo de ácido) y se continúa valorando hasta un pH de 4,4 para la alcalinidad intermedia (AI). También se anota el consumo de ácido hasta llegar a pH 4,3 y pH 4 para determinar la concentración de AGV según Kapp. Las expresiones para el cálculo de alcalinidad según los diferentes criterios se muestran en los Anexos VIII y IX.

2.5) Cuantificación de azúcares reductores por el método de Miller.

Equipos y materiales: Balanza analítica (Marca Sartorius), espectrofotómetro UV-VIS (marca Rayleigh UV-1800), agitador magnético (IKA® RH basic 2), matraces aforados (50 y 500 mL), beaker (50 mL y 1000 mL), tubos de ensayo y pipetas (1, 5 y 10 mL).

Disoluciones empleadas: patrón de glucosa de 2 g/L, ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), agua destilada. Su preparación se describe en el Anexo X.

Procedimiento:

1. Se debe realizar la preparación de las muestras de la misma forma que para el análisis de la DQO soluble.
2. Se preparan soluciones patrón de glucosa de concentraciones: 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5 y 1,75 g/L a partir de la de 2 g/L y se añade 1 mL de cada patrón, de muestra y de blanco (agua desionizada) en tubos de ensayo.
3. Se adicionan en cada tubo 2 mL de la disolución de ácido 3,5-dinitrosalicílico preparada previamente, y se colocan en baño María durante 10 min. Luego se pasan a un baño de agua fría durante otros 10 min y se agitan para parar la reacción. El contenido de los tubos se diluye tomando 1 mL y agregándole 4 mL de agua desionizada y se homogeniza.
4. Se llenan las cubetas con el contenido de los tubos de ensayo y se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm.

2.6) Extracción de cera.

Equipos y materiales: termostato (marca EQL), rotoevaporador (modelo IKA® RV 05 basic), extractor Soxhlet, bomba de vacío, balón de rotoevaporador de 1 L, dedal, condensador, balón de fondo redondo de 500 mL, soporte universal, pinzas universales, papel de filtro (Whatman N°40), mangueras y conectores, algodón.

Disoluciones empleadas: etanol 96°GL.

Procedimiento:

1. Se colocaron muestras de cachaza de 7 a 10 g en cada dedal según su capacidad, se cubrieron con algodón y se colocaron en el extractor Soxhlet individualmente para realizar las extracciones.

2. Se añadieron 250 mL de etanol 96°GL en el balón para cada extracción, se acopló al extractor y este al condensador y se colocó en el termostato.
3. Se inició la circulación de agua al condensador (después de colocar adecuadamente las mangueras) y se encendió el termostato. La extracción de la cera se realizó durante dos horas y 30 min según San Anastacio-Rebollar et al. (2017), Sluiter et al. (2005b).
4. Después de finalizada la extracción se sacó el dedal del extractor Soxhlet, se retiró el algodón y el contenido se trasvasó al embudo Buchner en el cual se colocó primeramente un papel de filtro. Se realizó la filtración de las muestras y se incluyeron tres lavados con etanol 96°GL, el cual fue recuperado por rotoevaporación.
5. Finalizada la filtración el contenido del papel de filtro se trasvasó a cápsulas de porcelana previamente pesadas y se dejó secar a temperatura ambiente. Luego se guardó en bolsas de plástico a 4°C hasta su uso posterior.

Capítulo III: Propuesta Metodológica

PROPUESTA METODOLÓGICA

En este capítulo se define una Propuesta Metodológica para la evaluación del pretratamiento de la cachaza sin cera (Fig. 16) y se realiza una aplicación parcial de la misma, teniendo en cuenta los procedimientos publicados por Janke et al. (2019a), López González et al. (2013), San Anastacio-Rebollar et al. (2017).

3.1) Propuesta Metodológica para la evaluación del pretratamiento.

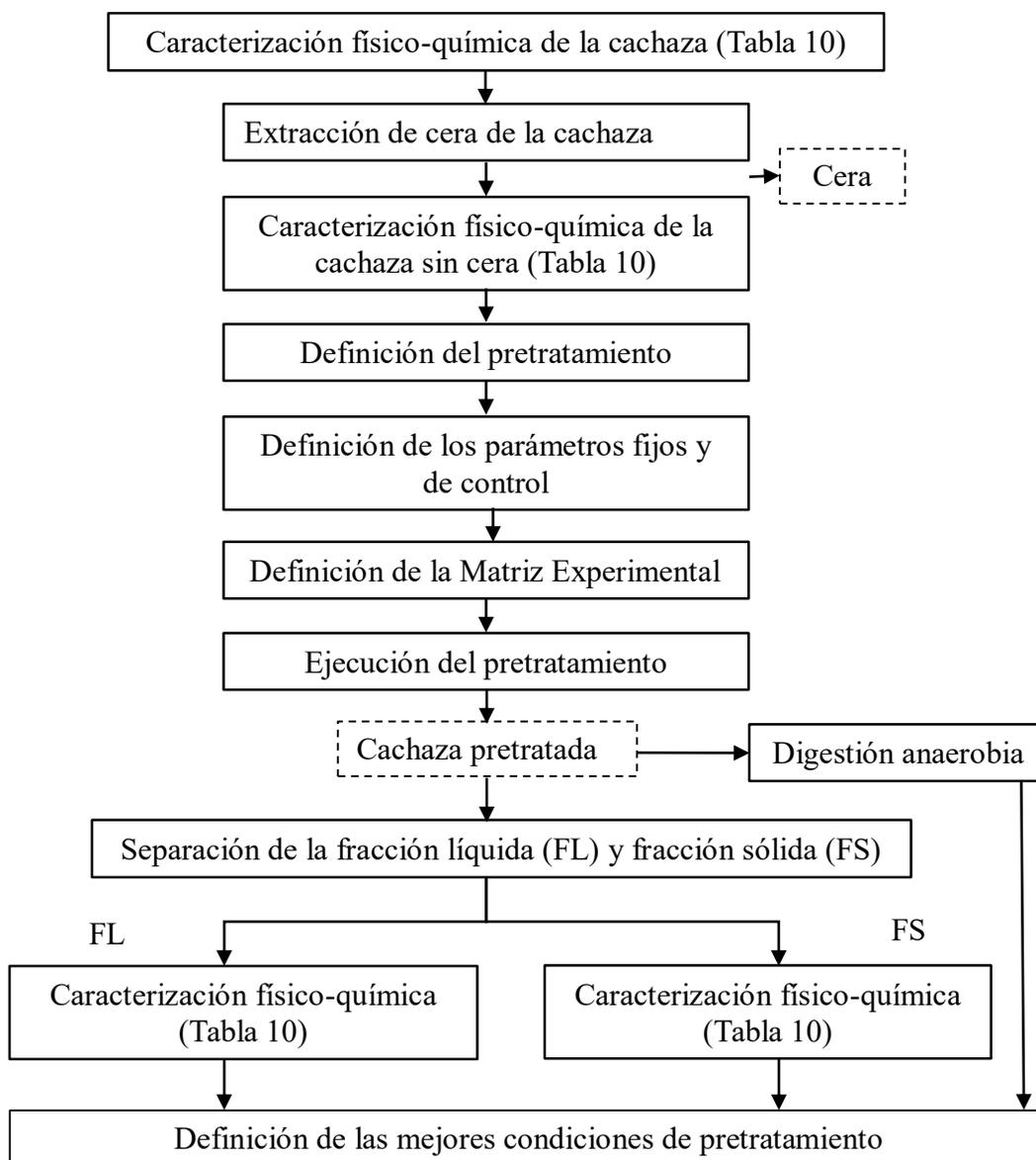


Fig. 16: Propuesta Metodológica para la evaluación del pretratamiento de la cachaza sin cera.

Se concibe la caracterización físico-química de la cachaza con cera y después de la extracción de cera. La cachaza sin cera se somete a las condiciones de pretratamiento seleccionadas y luego se separa en dos fracciones (FS y FL) por centrifugación. A ambas fracciones se les realizan diferentes análisis de acuerdo a la tabla 10.

Tabla 10: Principales análisis para evaluar el efecto del pretratamiento.

Análisis	Métodos	Cachaza	Cachaza sin cera	Cachaza sin cera pretratada	
				FL	FS
DQO soluble	Método dicromato	x	x	x	-
pH	Potenciometría	x	x	x	-
ST	Gravimetría	x	-	-	-
SV	Gravimetría	x	-	-	-
Cenizas	Gravimetría	x	-	-	-
Nitrógeno, proteínas	Kjeldahl	x	x	x	x
AGV	Titulación	x	x	x	
Compuestos fenólicos	Espectrofotometría	x	x	x	-
Furfural y HMF	Espectrofotometría	x	x	x	-
Carbohidratos no fibrosos	Dubois, Miller	x	x	x	-
Hemicelulosa	Van Soest	-	-	-	x
Celulosa	Van Soest	-	-	-	x
Lignina	Van Soest	-	-	-	x

3.2) Aplicación parcial de la propuesta.

Se realiza una aplicación parcial de la propuesta hasta la definición de la matriz experimental:

1. Caracterización físico-química de la cachaza.

Los resultados obtenidos de los análisis aplicados a la cachaza con cera y cuyos procedimientos fueron descritos en el Capítulo II se muestran en la tabla 11. Las curvas de calibración para la

determinación de la DQO soluble por vía colorimétrica y de la concentración de azúcares reductores totales se encuentran en los Anexos XI y XII, respectivamente.

Tabla 11. Características determinadas a la cachaza antes de la extracción.

Análisis	Unidad	Valor obtenido	Valores reportados en la literatura
DQO soluble	g/L	13,2 ^c ; 15,15 ^v	10-20
pH		6,13	6-6,3
ST	%	94,53	85-95
SV	%	70,42	70-80
Cenizas	%	29,58	20-30
Azúcares reductores	%	9,312	5-15
AGV	mg CH ₃ COOH/L	1751	265 ^b , 4652 ^d

^c: vía colorimétrica; ^v: vía volumétrica; ^b: (López González et al., 2014) y ^d: (Janke et al., 2019b).

Los resultados mostrados en la tabla se encuentran en el rango reportado en la literatura consultada en el Capítulo I (Tabla I), por lo que se puede decir que los métodos fueron desarrollados correctamente. Esto se puede constatar, para el caso de azúcares y DQO en la buena correlación lineal observada en las curvas de calibración. En el caso de los AGV los valores reportados difieren del que se determinó experimentalmente ya que el método empleado no fue el mismo y también debido a las características variables de la cachaza relacionadas con el cultivo de la caña y con su proceso de obtención.

2. Extracción de cera de la cachaza.

Se realizó la extracción de cera por el método Soxhlet, efectuándose de dos a tres por día para un total de 32 extracciones, con un porcentaje medio de cachaza sin cera obtenida del 81,62 %, equivalente a un total de 217 g. Los cálculos se muestran en el Anexo XIII.

3. Definición del pretratamiento.

Se define el pretratamiento termoalcalino por ser este método efectivo en lograr altos niveles de delignificación y conversión de celulosa, además de una mejor solubilización de la biomasa,

que facilita el proceso de DA y provoca un aumento en el rendimiento de metano, lo cual se ha demostrado en pretratamientos realizados a la cachaza con cera según la revisión bibliográfica presentada en el capítulo I.

4. Definición de los parámetros fijos y de control.

Se define como parámetro fijo la CA a emplear y como parámetros de control el tiempo y la temperatura.

5. Matriz de diseño experimental.

Los niveles de los parámetros fijos y de control se seleccionaron según la información obtenida de la bibliografía consultada en el capítulo I (Tabla 3). Se utiliza un diseño experimental 2^2 (Tabla 12) con la temperatura y el tiempo como parámetros de control, y se decide mantener constante una CA de 6 g álcalis/100 g ST (2 g Ca(OH)_2 /100 g ST + 4 g NaOH/100 g ST) y una carga de agua de 10 g/g ST de cachaza para todas las corridas (Chang et al., 1998).

Tabla 12: Diseño experimental.

	Valores codificados		Valores reales	
Temperatura (°C)	-1	+1	60	80
Tiempo (min)	+1	-1	30	60

Se realizarán tres réplicas de cada pretratamiento empleando como reactores botellas *Schott* de 500 mL. Al terminar el tiempo de experimentación, se colocarán en un baño con hielo granizado para finalizar la reacción. Posteriormente las muestras pretratadas se centrifugarán por 30 min a 6500 rpm, se separará la FL y se guardará a -20°C , mientras que la FS se someterá a sucesivos lavados con agua, se secará y se guardará en bolsas a 4°C , para los análisis posteriores. Un procedimiento similar se realiza con la cachaza sin cera pero sin utilizar álcalis y a temperatura ambiente con una hora de agitación, para ver la influencia del pretratamiento en los resultados obtenidos.

CONCLUSIONES

- Se realizó una propuesta metodológica para la evaluación del efecto del pretratamiento de la cachaza sin cera, teniendo en cuenta lo reportado en la bibliografía consultada.
- Se realizó una aplicación parcial de la propuesta metodológica y se definió el pretratamiento termoalcalino con NaOH y Ca(OH)₂ bajo diferentes condiciones de tiempo y temperatura para ser aplicado a la cachaza sin cera.

RECOMENDACIONES

1. Continuar con la aplicación de la propuesta metodológica para la evaluación del efecto del pretratamiento de la cachaza sin cera.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 2018a. 2540 SOLIDS (2017). *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association.
2. 2018b. 4500-N NITROGEN (2017). *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association.
3. 2018c. 5220 CHEMICAL OXYGEN DEMAND (COD) (2017). *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association.
4. 2018d. 6200 VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS (2017). *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association.
5. 2020. *Biomass Compositional Analysis Laboratory Procedures* [Online]. Available: www.nrel.gov/bioenergy/biomass-compositional-analysis.html [Accessed].
6. ABRAHAM, A., MATHEW, A. K., PARK, H., CHOI, O., SINDHU, R., PARAMESWARAN, B., PANDEY, A., PARK, J. H. & SANG, B.-I. 2020. Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 122725.
7. ALI SHAH, F., MAHMOOD, Q., MAROOF SHAH, M., PERVEZ, A. & AHMAD ASAD, S. 2014. Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis. *The Scientific World Journal*, 2014.
8. ANGELIDAKI, I., ALVES, M., BOLZONELLA, D., BORZACCONI, L., CAMPOS, J., GUWY, A., KALYUZHNYI, S., JENICEK, P. & VAN LIER, J. 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water science and technology*, 59, 927-934.
9. ASIKIN, Y., TAKAHASHI, M., HIROSE, N., HOU, D. X., TAKARA, K. & WADA, K. 2012. Wax, policosanol, and long-chain aldehydes of different sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars. *European journal of lipid science and technology*, 114, 583-591.
10. AVILA NÚÑEZ, R., RIVAS PÉREZ, B., HERNÁNDEZ MOTZEZAK, R. & CHIRINOS, M. 2012. Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. *Multiciencias*, 12, 129-135.
11. AZZAM, A. & EBRAHIM, M. 1986. Optimization of the extraction conditions of cane wax from filter press mud. *Fett-lipid*, 88, 151-154.
12. BAEZ-SMITH, C. 2008. Production of bioenergy using filter cake mud in sugar cane mill factories. *SPRI Florida, USA*.
13. BHOSALE, P., CHONDE, S. & RAUT, P. 2012. Studies on extraction of sugarcane wax from press mud of sugar factories from Kolhapur district, Maharashtra. *Journal of Environmental Research and Development*, 6, 715-720.
14. BRÉMOND, U., DE BUYER, R., STEYER, J.-P., BERNET, N. & CARRERE, H. 2018. Biological pretreatments of biomass for improving biogas production: an overview from lab scale to full-scale. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, 583-604.
15. BURKHARDT, S., KUMAR, L., CHANDRA, R. & SADDLER, J. 2013. How effective are traditional methods of compositional analysis in providing an accurate material balance for a range of softwood derived residues? *Biotechnology for biofuels*, 6, 90.

16. CASTRO VEGA, A. A., RODRÍGUEZ VARELA, L. I. & DÍAZ VELÁSQUEZ, J. D. J. 2007. Conversión hidrotérmica subcrítica de residuos orgánicos y biomasa: Mecanismos de reacción. *Ingeniería e Investigación*, 27, 41-50.
17. CHAKHATHANBORDEE, R., KHOTAVIVATTANA, S. & SRIROTH, K. 2016. Development of sugarcane wax extraction methods from sugarcane filter cake for value creation. *VRU Research and Development Journal Science and Technology*, 11, 95-106.
18. CHANG, M., LI, D., WANG, W., CHEN, D., ZHANG, Y., HU, H. & YE, X. 2017. Comparison of sodium hydroxide and calcium hydroxide pretreatments on the enzymatic hydrolysis and lignin recovery of sugarcane bagasse. *Bioresource technology*, 244, 1055-1058.
19. CHATTERJEE, B., RADHAKRISHNAN, L. & MAZUMDER, D. 2018. New approach for determination of volatile fatty acid in anaerobic digester sample. *Environmental Engineering Science*, 35, 333-351.
20. CHAVIANO, L. D., FERNÁNDEZ, L. G., CECILIA, A. H., RAMOS, G. V. & ORTIZ, E. R. 2000. Influencia de diferentes variables en la extracción de cera cruda. *Centro Azúcar*, 27, 59-63.
21. CHEN, R., WANG, Y.-Z., LIAO, Q., ZHU, X. & XU, T.-F. 2013. Hydrolysates of lignocellulosic materials for biohydrogen production. *BMB reports*, 46, 244-251.
22. CHI, C., ZHANG, Z., CHANG, H.-M. & JAMEEL, H. 2009. Determination of Furfural and Hydroxymethylfurfural Formed From Biomass Under Acidic Conditions. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 29, 265-276.
23. CHROMÝ, V., VINKLÁRKOVÁ, B., ŠPRONGL, L. & BITTOVÁ, M. 2015. The Kjeldahl method as a primary reference procedure for total protein in certified reference materials used in clinical chemistry. I. A review of Kjeldahl methods adopted by laboratory medicine. *Critical reviews in analytical chemistry*, 45, 106-111.
24. CIOLACU, D., CIOLACU, F. & POPA, V. I. 2011. Amorphous cellulose—structure and characterization. *Cellulose chemistry and technology*, 45, 13.
25. DAHUNSI, S. 2019. Mechanical pretreatment of lignocelluloses for enhanced biogas production: Methane yield prediction from biomass structural components. *Bioresource technology*, 280, 18-26.
26. DE ANDRADE, J. K., DE ANDRADE, C. K., KOMATSU, E., PERREAULT, H., TORRES, Y. R., DA ROSA, M. R. & FELSNER, M. L. 2017. A validated fast difference spectrophotometric method for 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) determination in corn syrups. *Food chemistry*, 228, 197-203.
27. DEVIA-ORJUELA, J. S., ALVAREZ-PUGLIESE, C. E., DONNEYS-VICTORIA, D., MARRIAGA CABRALES, N., HO, B., EDITH, L., BRÉM, B., SAUCIUC, A., GÁL, E. & ESPIN, D. 2019. Evaluation of Press Mud, Vinasse Powder and Extraction Sludge with Ethanol in a Pyrolysis Process. *Energies*, 12, 4145.
28. DU, J., QIAN, Y., XI, Y. & LÜ, X. 2019. Hydrothermal and alkaline thermal pretreatment at mild temperature in solid state for physicochemical properties and biogas production from anaerobic digestion of rice straw. *Renewable energy*, 139, 261-267.
29. DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. & SMITH, F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
30. FAO 2019. World Food and Agriculture—Statistical Pocketbook. 28.

31. FROST, G. & SCHOLES, E. 2013. *DETERMINATION OF VOLATILE FATTY ACID CONCENTRATION IN ANAEROBIC REACTOR EFFLUENT BY STANDARD ACID TITRATION*.
32. GARCÍA-TORRES, R. 2011. Uso de cachaza y bagazo de caña de azúcar en la remoción de hidrocarburos en suelo contaminado.
33. GARCÍA, A., GARCÍA, M. A., RIBAS, M. & BROWN, A. 2003. Recuperación de cera de cutícula de caña de azúcar mediante separación mecánica y extracción con solventes. *Grasas y aceites*, 54, 169-174.
34. GARCÍA MARTÍNEZ, E. M., FERNÁNDEZ SEGOVIA, I. & FUENTES LÓPEZ, A. 2015. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.
35. GARROTE, G., DOMINGUEZ, H. & PARAJO, J. 1999. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz als Roh-und Werkstoff*, 57, 191-202.
36. GIL, D. B., BOCOURT, E. C. & MAQUEIRA, Y. D. 2006. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3, 5 dinitrosalicílico. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 40, 45-50.
37. GONZÁLEZ, L. M. L., REYES, I. P., DEWULF, J., BUDDE, J., HEIERMANN, M. & VERVAEREN, H. 2014. Effect of liquid hot water pre-treatment on sugarcane press mud methane yield. *Bioresource Technology*, 169, 284-290.
38. GONZÁLEZ, L. M. L., VERVAEREN, H., REYES, I. P., DUMOULIN, A., ROMERO, O. R. & DEWULF, J. 2013. Thermo-chemical pre-treatment to solubilize and improve anaerobic biodegradability of press mud. *Bioresource technology*, 131, 250-257.
39. GUAN, R., LI, X., WACHEMO, A. C., YUAN, H., LIU, Y., ZOU, D., ZUO, X. & GU, J. 2018. Enhancing anaerobic digestion performance and degradation of lignocellulosic components of rice straw by combined biological and chemical pretreatment. *Science of the Total Environment*, 637, 9-17.
40. GUMISIRIZA, R., HAWUMBA, J. F., OKURE, M. & HENSEL, O. 2017. Biomass waste-to-energy valorisation technologies: a review case for banana processing in Uganda. *Biotechnology for biofuels*, 10, 11.
41. HAMES, B., SCARLATA, C. & SLUITER, A. 2008. Determination of protein content in biomass. *National Renewable Energy Laboratory*, 1-5.
42. HAMES, B. R. 2009. Biomass compositional analysis for energy applications. *Biofuels*. Springer.
43. HASHEMI, S. S., KARIMI, K. & MIRMOHAMADSADEGHI, S. 2019. Hydrothermal pretreatment of safflower straw to enhance biogas production. *Energy*, 172, 545-554.
44. HENDRIKS, A. T. W. M. & ZEEMAN, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100, 10-18.
45. HERNÁNDEZ-BELTRÁN, J. U., LIRA, H.-D., OMAR, I., CRUZ-SANTOS, M. M., SAUCEDO-LUEVANOS, A., HERNÁNDEZ-TERÁN, F. & BALAGURUSAMY, N. 2019. Insight into pretreatment methods of lignocellulosic biomass to increase biogas yield: current state, challenges, and opportunities. *Applied Sciences*, 9, 3721.
46. HERNÁNDEZ GÓMEZ, D. 2019. Contenido en polifenoles de subproductos agrícolas y agroindustriales de la Vega Baja del Segura.
47. HOSTALET, A., BETORET, N. & SEGUÍ, L. 2011. *Determinación de las propiedades antioxidantes del zumo de caña, panela y azúcar moreno*. Thesis MSc, Universidad Politécnica Valencia, Spain.

48. HUAMÁN CASTILLA, N., ALLCCA, E., LEÓN, N. & YUPANQUI, G. 2017. Uso de edulcorantes comerciales como una alternativa a la reducción de 5-Hidroximetil-2-Furfural (HMF) en galletas modelo. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 83, 213-220.
49. INARKAR, M. B. & LELE, S. 2012. Extraction and characterization of sugarcane peel wax. *ISRN Agronomy*, 2012.
50. JAIMES, L. J., GIRALDO, A. M. & CORREA, H. J. 2018. De Parmentier a Van Soest y más allá: un análisis histórico del concepto y métodos de determinación de la fibra en alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*, 30.
51. JANKE, L., LEITE, A., BATISTA, K., WEINRICH, S., STRÄUBER, H., NIKOLAUSZ, M., NELLES, M. & STINNER, W. 2016. Optimization of hydrolysis and volatile fatty acids production from sugarcane filter cake: Effects of urea supplementation and sodium hydroxide pretreatment. *Bioresource Technology*, 199, 235-244.
52. JANKE, L., MCCABE, B. K., HARRIS, P., HILL, A., LEE, S., WEINRICH, S., MARCHUK, S. & BAILLIE, C. 2019a. Ensiling fermentation reveals pre-treatment effects for anaerobic digestion of sugarcane biomass: An assessment of ensiling additives on methane potential. *Bioresource technology*, 279, 398-403.
53. JANKE, L., WEINRICH, S., LEITE, A. F., STRÄUBER, H., NIKOLAUSZ, M., NELLES, M. & STINNER, W. 2019b. Pre-treatment of filter cake for anaerobic digestion in sugarcane biorefineries: Assessment of batch versus semi-continuous experiments. *Renewable Energy*, 143, 1416-1426.
54. JANKE, L., WEINRICH, S., LEITE, A. F., STRÄUBER, H., RADETSKI, C. M., NIKOLAUSZ, M., NELLES, M. & STINNER, W. 2018. Year-round biogas production in sugarcane biorefineries: Process stability, optimization and performance of a two-stage reactor system. *Energy Conversion and Management*, 168, 188-199.
55. JOSÉ, M. & ARELLANO, V. 2020. *Titulo Evaluación de cachaza fresca y descompuesta como abono orgánico en el rendimiento de arveja (pisum sativum l.) variedad piquinegra, en la granja experimental "La Pradera"*.
56. JURADO TEIXEIRA, B., APARCANA ATAURIMA, I. M., INCA, V., STEFFANI, L., RAMOS LLICA, E., CALIXTO COTOS, M. R., HURTADO MANRIQUE, P. E. & ACOSTA ALFARO, K. M. D. C. 2016. Evaluación del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de los frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) de diferentes lugares del Perú. *Revista de la sociedad química del Perú*, 82, 272-279.
57. KARIMI, K., SHAFIEI, M. & KUMAR, R. 2013. Progress in physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biofuel technologies*. Springer.
58. KARIMI, K. & TAHERZADEH, M. J. 2016. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: composition, imaging, and crystallinity. *Bioresource technology*, 200, 1008-1018.
59. KARUPPIAH, T. & EBENEZER, V. 2019. Biomass Pretreatment for Enhancement of Biogas Production.
60. KAUR, K. & PHUTELA, U. G. 2016. Enhancement of paddy straw digestibility and biogas production by sodium hydroxide-microwave pretreatment. *Renewable Energy*, 92, 178-184.

61. KREUGER, E., NGES, I. A. & BJÖRNSSON, L. 2011. Ensiling of crops for biogas production: effects on methane yield and total solids determination. *Biotechnology for Biofuels*, 4, 44.
62. KUMAR, R. & WYMAN, C. E. 2013. Physical and chemical features of pretreated biomass that influence macro-/micro-accessibility and biological processing. *Aqueous pretreatment of plant biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals*, 281-310.
63. KUMAR, S., MEENA, R. S., JINGER, D., JATAV, H. & BANJARA, T. 2017. *Use of pressmud compost for improving crop productivity and soil health*.
64. LI, H., FANG, Z., SMITH JR, R. L. & YANG, S. 2016. Efficient valorization of biomass to biofuels with bifunctional solid catalytic materials. *Progress in Energy and Combustion Science*, 55, 98-194.
65. LIEBETRAU, J., PFEIFFER, D. & THRÄN, D. 2016. Collection of Methods for Biogas: Methods to determine parameters for analysis purposes and parameters that describe processes in the biogas sector. *Biomass Energy Use*, 7.
66. LÓPEZ-GONZÁLEZ, L. M., PEREDA-REYES, I., PEDRAZA-GÁRCIGA, J., BARRERA, E. L. & ROMERO-ROMERO, O. 2019. Effects of press- mud pre-treatment on the feasibility of biogas production. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, 51-59.
67. LÓPEZ-LEGARDA, X., TARAMUEL-GALLARDO, A., ARBOLEDA-ECHAVARRÍA, C., SEGURA-SÁNCHEZ, F. & RESTREPO-BETANCUR, L. F. 2017. Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Revista Cubana de Química*, 29, 180-198.
68. LÓPEZ GONZÁLEZ, L. M. 2016. *Análisis de alternativas de Producción Más Limpias (PML) para la producción de biogás con fines energéticos en una empresa azucarera diversificada*. Universidad Central "Marta Abreu de Las Villas", Cuba.
69. LÓPEZ GONZÁLEZ, L. M., PEREDA REYES, I., DEWULF, J., BUDDE, J., HEIERMANN, M. & VERVAEREN, H. 2014. Effect of liquid hot water pre-treatment on sugarcane press mud methane yield. *Bioresource Technology*, 169, 284-290.
70. LÓPEZ GONZÁLEZ, L. M., VERVAEREN, H., PEREDA REYES, I., DUMOULIN, A., ROMERO, O. & DEWULF, J. 2013. Thermo-chemical pre-treatment to solubilize and improve anaerobic biodegradability of press mud. *Bioresource technology*, 131C, 250-257.
71. LORENZO, Y. & ABREU, M. 2005. La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, XXXIX, 35-48.
72. MANCINI, G., PAPIRIO, S., LENS, P. N. & ESPOSITO, G. 2018. Increased biogas production from wheat straw by chemical pretreatments. *Renewable energy*, 119, 608-614.
73. MATEUS, L., HERNÁNDEZ, O., VELÁSQUEZ, M. & DÍAZ, J. D. J. 2012. Evaluación del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido del pasto maralfalfa (*Pennisetum glaucum* x *Pennisetum purpureum*) para la producción de etanol. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14, 146-156.
74. MEEGODA, J., LI, B., PATEL, K. & WANG, L. 2018. A Review of the Processes, Parameters, and Optimization of Anaerobic Digestion. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15, 2224.

75. MKHIZE, N. T., MSAGATI, T. A., MAMBA, B. B. & MOMBA, M. 2014. Determination of volatile fatty acids in wastewater by solvent extraction and gas chromatography. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 67, 86-92.
76. MONLAU, F., BARAKAT, A., LATRILLE, E., STEYER, J.-P. & CARRÈRE, H. Impact of various thermo chemical pretreatments on solubilisation and methane production of sunflower stalks. 2011.
77. MONTOYA R, M. I., QUINTERO S, J. A., SÁNCHEZ T, Ó. J. & CARDONA A, C. A. 2006. Evaluación del impacto ambiental del proceso de obtención de alcohol carburante utilizando el algoritmo de reducción de residuos. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, 85-95.
78. MOORE, S. A., AI, Y., CHANG, F. & JANE, J.-L. 2015. Effects of alpha-amylase reaction mechanisms on analysis of resistant-starch contents. *Carbohydrate polymers*, 115, 465-471.
79. MULAT, D. G., HUERTA, S. G., KALYANI, D. & HORN, S. J. 2018. Enhancing methane production from lignocellulosic biomass by combined steam-explosion pretreatment and bioaugmentation with cellulolytic bacterium *Caldicellulosiruptor bescii*. *Biotechnology for biofuels*, 11, 19.
80. MUÑOZ SOLARES, M. 2019. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE LA CERA DE CACHAZA COMO UN COPRODUCTO DE LA CAÑA DE AZÚCAR.
81. NIMBALKAR, P. R., KHEDKAR, M. A., GAIKWAD, S. G., CHAVAN, P. V. & BANKAR, S. B. 2017. New Insight into Sugarcane Industry Waste Utilization (Press Mud) for Cleaner Biobutanol Production by Using.
82. NITSOS, C. K., MATIS, K. A. & TRIANTAFYLIDIS, K. S. 2013. Optimization of hydrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass in the bioethanol production process. *ChemSusChem*, 6, 110-122.
83. NKEMKA, V. N., LI, Y. & HAO, X. 2016. Effect of thermal and alkaline pretreatment of giant miscanthus and Chinese fountaingrass on biogas production. *Water Science and Technology*, 73, 849-856.
84. NOSRATPOUR, M. J., KARIMI, K. & SADEGHI, M. 2018. Improvement of ethanol and biogas production from sugarcane bagasse using sodium alkaline pretreatments. *Journal of environmental management*, 226, 329-339.
85. NOSSA GONZÁLEZ, D. L., TALERO PÉREZ, Y. V., NÚÑEZ, R. & ELÍAS, W. 2016. Determinación del contenido de polifenoles y actividad antioxidante de los extractos polares de comfrey (*Symphytum officinale* L). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21, 125-132.
86. OBREGÓN, J. M. R., GUTIÉRREZ, R. B., GONZÁLEZ, L. L., HERNÁNDEZ, J. J. & PÉREZ, L. M. 2018. Análisis cinético de la biodegradabilidad anaerobia de la cachaza con pretratamiento termoalcalino en la producción de metano. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, 7, 12-18.
87. ORTIZ, W. G. C., GORDILLO, J. F. I., VELÁSQUEZ, L. M. C. & BUENO, A. F. H. 2015. Cuantificación de azúcares reductores en las cáscaras de naranja y banano. *Revista de Tecnología*, 12.
88. OSTOVAREH, S., KARIMI, K. & ZAMANI, A. 2015. Efficient conversion of sweet sorghum stalks to biogas and ethanol using organosolv pretreatment. *Industrial Crops and Products*, 66, 170-177.

89. PAWAR, S. S., CHAVAN, P. & BANKAR, S. 2017. Production of bio-ethanol from biomass (press mud). *Int. J. Adv. Res. Ideas Innovat. Technol.*, 1, 1550-1555.
90. PENA PARRA, Y. 2019. *Estudio de extracción de aceite a partir de la cachaza de la cana de azúcar para obtención de Biolubricante. Potencialidades economicas.*
91. PÉREZ-MORALES, V. & VILLANUEVA-RAMOS, G. 2012. Posibilidades de reconversión de una fábrica de cera cruda para la elaboración de productos de alto valor agregado Possibilities of revamping a cera factory for the elaboration of products of high added value. *Centro Azúcar*, 39, 36-42.
92. PÉREZ, G., ESPINOSA-GONZÁLEZ, C. & TORRES TORRES, J. 2019. *LIBRO Catalizadores Al₂O₃-TiO₂-W.*
93. PILARSKI, K., PILARSKA, A. A., WITASZEK, K., DWORECKI, Z., ŻELAZIŃSKI, T., EKIELSKI, A., MAKOWSKA, A. & MICHNIEWICZ, J. 2016. The impact of extrusion on the biogas and biomethane yield of plant substrates. *Journal of Ecological Engineering*, 17.
94. QI, G., PENG, F., XIONG, L., LIN, X., HUANG, C., LI, H., CHEN, X. & CHEN, X. 2017. Extraction and characterization of wax from sugarcane bagasse and the enzymatic hydrolysis of dewaxed sugarcane bagasse. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 47, 276-281.
95. RODRIGUES, C. I. S., JACKSON, J. J. & MONTROSS, M. D. 2016. A molar basis comparison of calcium hydroxide, sodium hydroxide, and potassium hydroxide on the pretreatment of switchgrass and miscanthus under high solids conditions. *Industrial Crops and Products*, 92, 165-173.
96. SAN ANASTACIO-REBOLLAR, I. M., RICARDO-GARCÍA, D., HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, R. C., GUERRA-RODRÍGUEZ, L. E. & VILLANUEVA-RAMOS, G. 2017. Extracción de cera a partir de cachaza con etanol 96 °GL a escala de laboratorio. *Tecnología Química*, 37, 140-151.
97. SANT'ANNA, C. & DE SOUZA, W. 2012. Microscopy as a tool to follow deconstruction of lignocellulosic biomass. *Formatex Research Center, Espanha*, 639-645.
98. SAPCI, Z. 2013. The effect of microwave pretreatment on biogas production from agricultural straws. *Bioresource technology*, 128, 487-494.
99. SARANGI, B. K., MUDLIAR, S. N., BHATT, P., KALVE, S., CHAKRABARTI, T. & PANDEY, R. A. 2008. Compost from Sugar mill press mud and distillery spent wash for sustainable agriculture. *Dynamic Soil, Dynamic Plant*, 2, 35-49.
100. SARTO, S., HILDAYATI, R. & SYAICHURROZI, I. 2019. Effect of chemical pretreatment using sulfuric acid on biogas production from water hyacinth and kinetics. *Renewable Energy*, 132, 335-350.
101. SEGURA, F., ECHEVERRI, R., LL, A. C. P. & MEJÍA, A. I. 2007. Descripción y discusión acerca de los métodos de análisis de fibra y del valor nutricional de forrajes y alimentos para animales. *Vitae*, 14, 72-81.
102. SEN, B. & CHANDRA, T. S. 2007. Chemolytic and solid-state spectroscopic evaluation of organic matter transformation during vermicomposting of sugar industry wastes. *Bioresource technology*, 98, 1680-1683.
103. SHEN, J., ZHENG, Q., ZHANG, R., CHEN, C. & LIU, G. 2019. Co-pretreatment of wheat straw by potassium hydroxide and calcium hydroxide: Methane production,

- economics, and energy potential analysis. *Journal of environmental management*, 236, 720-726.
104. SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J. & TEMPLETON, D. 2005a. Determination of ash in biomass laboratory analytical procedure. *National Renewable Energy Laboratory*, 2-5.
 105. SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. & CROCKER, D. 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, in: Laboratory Analytical Procedure (LAP). *National Renewable Energy Laboratory*.
 106. SLUITER, A., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J. & TEMPLETON, D. 2005b. Determination of extractives in biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*, 1617.
 107. SLUITER, A., SLUITER, J. & WOLFRUM, E. J. 2013. Methods for biomass compositional analysis.
 108. SLUITER, J. B., RUIZ, R. O., SCARLATA, C. J., SLUITER, A. D. & TEMPLETON, D. W. 2010. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58, 9043-9053.
 109. SONG, Z.-L., YAG, G.-H., FENG, Y.-Z., REN, G.-X. & HAN, X.-H. 2013. Pretreatment of rice straw by hydrogen peroxide for enhanced methane yield. *Journal of Integrative Agriculture*, 12, 1258-1266.
 110. SONG, Z., GAIHEYANG, X. L., YAN, Z., YUAN, Y. & LIAO, Y. 2014. Comparison of seven chemical pretreatments of corn straw for improving methane yield by anaerobic digestion. *PloS one*, 9.
 111. TAHERZADEH, M. J. & KARIMI, K. 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International journal of molecular sciences*, 9, 1621-1651.
 112. TAUPIER, L. & BUGALLO, S. 2000. Manual de los derivados de la caña de azúcar. Habana, Cuba: Imprenta MINAZ.
 113. TEMPLETON, D. W., SCARLATA, C. J., SLUITER, J. B. & WOLFRUM, E. J. 2010. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 2. Method uncertainties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58, 9054-9062.
 114. TENA, M. & JORRIN, J. 2010. Extracción y ensayo de la actividad invertasa de levadura de panadería. *Bioquímica y Biología Molecular*, 32, 1-14.
 115. TEZARA, C., SIREGAR, J., LIM, H. Y., FAUZI, F. A., YAZDI, M., MOEY, L. K. & JIN WEI, L. 2016. Factors that affect the mechanical properties of kenaf fiber reinforced polymer: A review. 10, 2159-2175.
 116. TSAPEKOS, P., KOUGIAS, P. & ANGELIDAKI, I. 2015. Biogas production from ensiled meadow grass; effect of mechanical pretreatments and rapid determination of substrate biodegradability via physicochemical methods. *Bioresource technology*, 182, 329-335.
 117. VAN SOEST, P. J. 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. 2. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, 46, 829-835.
 118. VAN SOEST, P. J. & ROBERTSON, J. 1985. Analysis of forages and fibrous foods.

119. VAN SOEST, P. J., ROBERTSON, J. B. & LEWIS, B. A. 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597.
120. VARNERO, M. 2011. Manual de biogás. *Santiago de Chile, Chile: FAO*.
121. VELARDE, S., DE LEÓN, O., CUÉLLAR, A. & VILLEGAS, D. 2004. Producción y aplicación de compost. *La Habana: INICA*.
122. WANG, S., LI, F., WU, D., ZHANG, P., WANG, H., TAO, X., YE, J. & NABI, M. 2018. Enzyme pretreatment enhancing biogas yield from corn stover: Feasibility, optimization, and mechanism analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66, 10026-10032.
123. WEINRICH, S. 2018. *Value of Batch Tests for Biogas Potential Analysis: Method Comparison and Challenges of Substrate and Efficiency Evaluation of Biogas Plants*, IEA Bioenergy.
124. WEISSBACH, F. The future of forage conservation. Proceedings of the II International Silage Conference on Forage Quality and Conservation, November, 2011. 16-19.
125. WEISSBACH, F. & STRUBELT, C. 2008a. Correcting the dry matter content of grass silages as a substrate for biogas production. *Landtechnik*, 63, 210-246.
126. WEISSBACH, F. & STRUBELT, C. 2008b. Correcting the dry matter content of maize silages as a substrate for biogas production. *Landtechnik*, 63, 82-83.
127. WEISSBACH, F. & STRUBELT, C. 2008. Correcting the dry matter content of sugar beet silages as a substrate for biogas production. *Landtechnik*, 63, 354-355.
128. WILSON, C. A. & NOVAK, J. T. 2009. Hydrolysis of macromolecular components of primary and secondary wastewater sludge by thermal hydrolytic pretreatment. *Water research*, 43, 4489-4498.
129. XIN, L., GUO, Z., XIAO, X., PENG, C., ZENG, P., FENG, W. & XU, W. 2019. Feasibility of anaerobic digestion on the release of biogas and heavy metals from rice straw pretreated with sodium hydroxide. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 19434-19444.
130. XU, F., YU, J., TESSO, T., DOWELL, F. & WANG, D. 2013. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: a mini-review. *Applied energy*, 104, 801-809.
131. YOU, Z., ZHANG, S., KIM, H., CHIANG, P.-C., SUN, Y., GUO, Z. & XU, H. 2019. Effects of corn stover pretreated with NaOH and CaO on anaerobic co-digestion of swine manure and corn stover. *Applied Sciences*, 9, 123.
132. YU, P., DAMIRAN, D., AZARFAR, A. & NIU, Z. 2011. Detecting molecular features of spectra mainly associated with structural and non-structural carbohydrates in co-products from bioethanol production using DRIFT with uni- and multivariate molecular spectral analyses. *International journal of molecular sciences*, 12, 1921-1935.
133. ZAREI, A. R. 2009. Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Furfural in Water Samples After Mixed Micelle-Mediated Extraction. *Acta Chimica Slovenica*, 56.
134. ZHANG, H., PING, Q., ZHANG, J. & LI, N. 2017. Determination of Furfural and Hydroxymethyl furfural by UV Spectroscopy in ethanol-water hydrolysate of Reed. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 2, 170-174.

135. ZHANG, Q., HU, J. & LEE, D.-J. 2016a. Biogas from anaerobic digestion processes: Research updates. *Renewable Energy*, 98, 108-119.
136. ZHANG, Z., ZHANG, G., LI, W., LI, C. & XU, G. 2016b. Enhanced biogas production from sorghum stem by co-digestion with cow manure. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, 9153-9158.
137. ZHENG, Y., ZHAO, J., XU, F. & LI, Y. 2014. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*, 42, 35-53.
138. ZHOU, J., YAN, B., WANG, Y., YONG, X., YANG, Z., JIA, H., JIANG, M. & WEI, P. 2016. Effect of steam explosion pretreatment on the anaerobic digestion of rice straw. *RSC advances*, 6, 88417-88425.
139. ZOHOROVIĆ, M., ANDREJAŠ, F., S, V., SELIMBASIC, V., DJOZIC, A. & SALKIĆ, M. 2016. *Defining key parameters to control the anaerobic digestion of organic matter*.

ANEXOS

I. Expresiones para el cálculo de ST, SV y cenizas:

$$\% \text{ ST} = (\text{pt}_{\text{final-PC}}) * 100 / (\text{pt}_{\text{inicial-PC}})$$

$$\% \text{ SV} = [(\text{pt}_{\text{final-PC}}) - (\text{pt}_{\text{final-550}^\circ\text{C-PC}})] * 100 / (\text{pt}_{\text{final-110}^\circ\text{C-PC}})$$

$$\text{Cenizas} = \% \text{ ST} - \% \text{ SV}$$

II. Determinación del porcentaje de ST, SV y cenizas:

Pc	pt _{inicial}	pt _{final}	pt _{final-PC}	pt _{final-550°C}	pt _{final-550°C-PC}	% ST	% SV	% Cenizas
25,0009	4,0037	28,7959	3,795	26,1261	1,1252	94,79	70,35	29,65
35,9296	4,0076	39,7313	3,8017	37,0709	1,1413	94,86	69,98	30,02
31,488	4,0031	35,2488	3,7608	32,5809	1,0929	93,95	70,94	29,06
						94,53	70,42	29,58

Los valores que aparecen en las casillas señaladas constituyen la media de los parámetros determinados que aparecen en cada columna.

III. Preparación de las disoluciones necesarias para calibración del pH-metro y el almacenamiento del electrodo:

- Disolución saturada de cloruro de potasio (KCl) 3 mol/L para almacenamiento del electrodo de pH y para su relleno: pesar 111,75 g de KCl puro para análisis (p.a), trasvasar a un matraz de 500 mL, enrasar con agua destilada y homogenizar.
- Solución patrón de hidrogenoftalato de potasio 0,05 mol/L: Secar la sal durante dos horas a 110°C, disolver 10,21 g de la sal (p.a) en agua destilada, trasvasar a un matraz de 1000 mL y enrasar con agua destilada. Como preservador añadir 1mL de cloroformo o un cristal de timol. Esta solución tiene un **pH de 4,01** a 25°C y un $\Delta\text{pH}/\Delta\text{T}$ de 0,0014.

- Solución patrón de fosfatos: Hervir agua destilada (más de 1000 mL) y dejar enfriar, pesar 3,387 g de KH_2PO_4 (p.a), previamente secados a 110°C - 130°C durante 2 horas, y 3,533 g de Na_2HPO_4 , trasvasar a un matraz de 1000 mL, enrasar con agua destilada y homogenizar. Medir el pH de la disolución resultante. Añadir como conservador 1 mL de cloroformo o un cristal de timol. Esta solución tiene un **pH de 6,90** a 15°C , 6,88 a 20°C , 6,86 a 25°C , y 6,85 a 30°C .
- Solución patrón de Bórax ($\text{B}_4\text{O}_7\text{Na}_2 \times 10 \text{H}_2\text{O}$) 0,01 mol/L: Disolver 3,81 g de la sal (p.a) en agua destilada, trasvasar a un matraz de 1000 mL, enrasar con agua destilada y homogenizar. El pH de esta solución es de **9,22** a 20°C y de 9,17 a 25°C .

IV. Preparación de disoluciones para el análisis de DQO:

- Disolución estándar de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,0042 mol/L (agente oxidante): Añadir a 500 mL de H_2O destilada 1,2283 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (p.a), previamente secado a 105°C por dos horas, 167 mL de H_2SO_4 concentrado y, complete en balón volumétrico de 1000 mL. Almacene en botella ámbar a temperatura ambiente. El número de equivalencia del $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ es 6.
- Disolución estándar de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,0167 mol/L (agente oxidante): Añadir a 500 mL de H_2O destilada 4,903 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (p.a), previamente secado a 105°C por dos horas, 167 mL de H_2SO_4 concentrado, complete en balón volumétrico de 1000 mL. Almacene en botella ámbar a temperatura ambiente.
- Disolución estándar de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,0417 mol/L (agente oxidante): Añadir a 500 mL de H_2O destilada 12,2825 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (p.a), previamente secado a 105°C por dos horas, 167 mL de H_2SO_4 concentrado y completar en balón volumétrico de 1000 mL. Almacenar en botella ámbar a temperatura ambiente.

- Disolución de sulfato de hierro amoniacal (FAS) 0,04 mol/L: Disolver 15,6856 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (p.a) en agua destilada y añadirle 20 mL de H_2SO_4 concentrado. Trasvasarlo a un matraz aforado de 1000 mL, enrasar con agua destilada y homogenizar.
- Disolución de sulfato de hierro amoniacal (FAS) (0,1 mol/L): Disolver 39,2140 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (p.a) en agua destilada, añadirle 20mL de H_2SO_4 concentrado. Trasvasarlo a un matraz aforado de 1000mL, enrasar con agua destilada y homogenizar. Estandarice la solución diariamente empleando el blanco frío.
- Ácido Sulfúrico-Sulfato de plata (agente ácido): Adicionar Ag_2SO_4 grado técnico en polvo o en cristales a H_2SO_4 concentrado a razón de 10,0917 g de $\text{Ag}_2\text{SO}_4/\text{L}$ de H_2SO_4 (teniendo en cuenta que la densidad del H_2SO_4 a 20 °C es 1,84 g/mL). Esperar de 1 a 2 días para su total solubilización. Mezclar bien.
- Solución Indicadora de Ferroína: Disolver 1,485 g de 1,10-ortofenantrolina monohidratada (p.a) y 0,695 g de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (p.a) en agua destilada. Trasvasar a un matraz aforado de 100 mL, enrasar con agua destilada y homogenizar.
- Estándar de hidrogenoftalato de potasio (HFP): Triturar ligeramente y luego secar hasta peso constante a 110°C. Disolver 0,2125 g de hidrogenoftalato de potasio (p.a) en agua ultrapura y llevar a volumen en un balón volumétrico de 500 mL. El biftalato tiene una DQO teórica de 1,176 mgO_2/mg y la solución tiene una DQO teórica de 500 mgO_2/L . La solución es estable hasta tres meses si se conserva refrigerada; se debe verificar la presencia o ausencia de crecimiento biológico, y en caso afirmativo descartarla.

V. Precauciones a tener en cuenta en el análisis de DQO:

Precaución 1: Usar la careta de seguridad y guantes gruesos para proteger las manos del calor producido al mezclar el contenido de los tubos y mezclar minuciosamente antes de aplicar calor para prevenir el calentamiento local en el fondo del tubo y una posible reacción explosiva.

Precaución 2: A los 10 minutos de haber comenzado el proceso de digestión verificar que los tubos estén bien cerrados para que no ocurran derrames, debido a que con el aumento de la temperatura pueden dilatarse las tapas de los tubos y aflojarse un poco.

Precaución 3: Cuando se mezcle el agente ácido con el dicromato para preparar la mezcla oxidante, la mezcla resultante debe conservar el color, amarillo (si es $K_2Cr_2O_7$ 0,0042 o 0,0167 mol/L) o naranja (si es $K_2Cr_2O_7$ 0,0417 mol/L). Si aparece una coloración verdosa, indica que se encuentra fuera de rango de lectura y se debe repetir el procedimiento diluyendo la muestra en mayor proporción.

VI. Cálculos para determinar la DQO por el método volumétrico

DQO expresada en $mgO_2/L = ((A-B)*M*8000)/(mL \text{ de muestra})$

Donde: *A*: Volumen de FAS gastado por el Blanco después de la digestión en el bloque de calentamiento.

B: Volumen de FAS gastado por el control o la muestra después de la digestión en el bloque de calentamiento.

M: concentración en mol/L real del FAS

 8000: peso miliequivalente de Oxígeno*1000 mL/L.

La concentración real de FAS se calcula como: $C(\text{FAS})=(C_1*V_1)/V_2$

Donde: C_1 : Concentración equivalente de la solución estándar de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ utilizada (0,025; 0,1; 0,25 N).

V_1 : Volumen en mL de la solución estándar de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (1,5 mL).

V_2 : Volumen promedio consumido de FAS en la valoración (del blanco frío).

VII. Preparación de disoluciones para la determinación de alcalinidad.

- Solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) (0,0236 mol/L): Se secan de 3 a 5 g de estándar primario de Na_2CO_3 a 250°C por 4 horas y se dejan enfriar en una desecadora. Se pesan $2,5 \pm 0,2$ g, se transfiere a un frasco volumétrico de 1L, se mezcla, se disuelve con agua destilada y se enrasa. No se debe almacenar por más de una semana.
- Ácido clorhídrico (HCl) 0,1 mol/L: Se llena parcialmente un matraz de 1000 ml con aproximadamente 500 ml de agua destilada. Cuidadosamente se añaden 8,3 ml de HCl (p.a) al 35 % con densidad $1,189\text{g}/\text{cm}^3$, se enrasa con agua destilada y se homogeniza. Se estandariza con la solución de carbonato de sodio (0,0236 mol/L), preparada anteriormente, para ello, se toman 40 ml de la solución de Na_2CO_3 y se vierten en un erlenmeyer de 250 ml, se añaden 60 ml de agua destilada, y se titula potenciométricamente a un pH aproximado de 5. Se eleva el electrodo y se deja hervir suavemente durante 3-5 min cubriendo con un vidrio de reloj. Se enfría a temperatura ambiente y se concluye la operación titulando en el punto de inflexión de pH. Se calcula la normalidad según:

$$\text{Normalidad, } N = \frac{AxB}{53,00xC}$$

Donde: A = g de Na₂CO₃, pesados en el matraz de 1 L.

B = mL de solución de Na₂CO₃ tomados para titulación.

C = mL de ácido empleados.

Se utiliza la normalidad medida en los cálculos.

VIII. Cálculos relacionados con la alcalinidad y la concentración de ácido acético.

Alcalinidad parcial (AP): $mg CaCO_3 / L = \frac{AxNx50000}{ml.de.muestra}$

Dónde: A= volumen de ácido consumido hasta pH=5 (mL)

N= concentración del ácido sulfúrico utilizado para valorar (N)

50= M (CaCO₃/Z*)= 100g/mol /2

1000 = factor de conversión a mg/L

mL de muestra: volumen de la muestra valorada (mL)

Para N=0,1 N y V_{muestra}=20 mL $mgCaCO_3 / L = Vx250$

Alcalinidad intermedia (AI): $mg(CH_3COOH)/L = [(B*1.66) - 0.15] x 500$

Donde: B: volumen de ácido consumido entre pH=5 y 4,4 (mL)

Alcalinidad total (AT) = AP+AI $Relación\ de\ alcalinidades = \frac{AI}{AP}$

IX. Cálculo de la concentración de AGV según Kapp.

$AGV = 131\ 340 * (V_{pH4,00} - V_{pH5,00}) * N_{H_2SO_4} / V_{muestra} - 3,08 * V_{pH4,3} * N_{H_2SO_4} * 1000 / V_{muestra} - 10,9$

Donde: AGV: Concentración de ácidos grasos volátiles (mg/L)

$V_{\text{pH}4,00}$: Volumen de ácido consumido hasta llegar a pH=4,0 (mL)

$V_{\text{pH}4,30}$: Volumen de ácido consumido hasta llegar a pH=4,3 (mL)

$V_{\text{pH}5,00}$: Volumen de ácido consumido hasta llegar a pH=5,0 (mL)

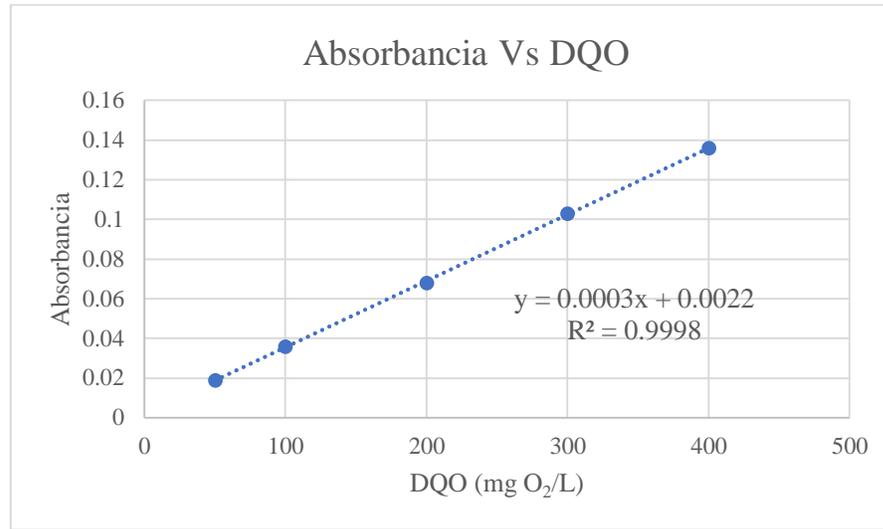
$N_{\text{H}_2\text{SO}_4}$: Normalidad del ácido (mol/L)

V_{muestra} : Volumen de muestra que se somete a titración (mL)

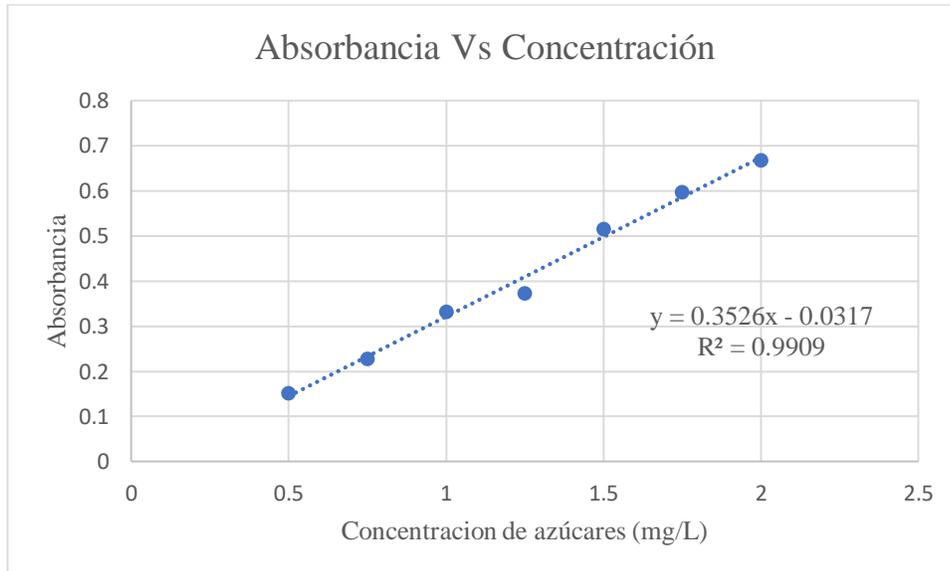
X. Preparación de disoluciones para la determinación de azúcares reductores.

- Solución de glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) 2 g/L: Se prepara pesando 2,0001 g de glucosa (p.a) y añadiéndola a un matraz aforado de 1000mL \pm 0,1mL, se diluye con agua desionizada, y se enrasa y homogeniza la solución final.
- Reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico: Se pesan 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), 150 g de tartrato de sodio-potasio y 8 g de NaOH. Se disuelve el NaOH en 200 mL de agua destilada y se añade en agitación el tartrato de sodio-potasio lentamente (todos los reactivos son puros para análisis). Se completa con agua destilada hasta 400 mL y se comienza a añadir lentamente el ácido 3,5-dinitrosalicílico. Se deja en agitación toda la noche, se enrasa a 500 mL y se filtra. Se guarda en frasco color ámbar, bajo refrigeración. La preparación del reactivo DNS en caliente se hace con agitación magnética y calentamiento.

XI. Curva de calibración empleada en la determinación colorimétrica de DQO:



XII. Curva de calibración empleada en la determinación de azúcares reductores.



XIII. Cálculos para determinar la masa total de cachaza sin cera obtenida de las extracciones:

Extracción	m ₀	m _F	% de cachaza sin cera
1	8,481	7,0427	83,04
2	7,0145	5,69	81,12
3	8,0256	6,605	82,30
4	8,0383	6,47	80,49
5	8,022	6,6927	83,43
6	8,2219	6,53	79,42
7	7,997	6,595	82,47
8	9,0151	7,26	80,53
9	9,93	8,4927	85,53
10	8,5321	6,96	81,57
11	8,0405	6,735	83,76
12	8,0393	6,62	82,35
13	8,0135	6,6327	82,77
14	8,2862	6,81	82,18
15	7,0293	5,755	81,87
16	8,5	7,05	82,94
17	8,2793	6,7027	80,96
18	8,2567	6,68	80,90
19	8,9011	7,17	80,55
20	8,601	7,025	81,68
21	8,9302	6,96	77,94
22	8,5792	7,2927	85,00
23	8,0587	6,46	80,16
24	6,9863	5,63	80,59
25	8,2234	6,705	81,54
26	8,3835	6,79	80,99
27	8,7366	7,0827	81,07
28	8,5017	6,85	80,57
29	9,0232	7,19	79,68
30	8,8199	7,255	82,26
31	8,82	7,19	81,52
32	8,2113	6,6227	80,65
	266,4984	217,5466	81,62

Los valores señalados se corresponden con la masa total de cachaza sometida a la extracción, la masa total de cachaza sin cera obtenida y el valor porcentual que representa, respectivamente.