



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

---

---

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA  
AGROINDUSTRIAL



MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
AGROALIMENTARIA

**APROBADA**



CARACTERIZACIÓN DE LIGNINA DE CÁSCARA  
DE CACAO COMO FUENTE DE MOLÉCULAS DE  
ALTO VALOR AGREGADO

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias

Presenta:

SEBASTIÁN GARCÍA FERNÁNDEZ

Bajo la supervisión de: BENITO REYES TREJO, DR



Chapingo, Estado de México, octubre de 2022

CARACTERIZACIÓN DE LIGNINA DE CÁSCARA DE CACAO  
COMO FUENTE DE MOLÉCULAS DE ALTO VALOR AGREGADO

Tesis desarrollada por SEBASTIÁN GARCÍA FERNÁNDEZ bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

DIRECTOR:



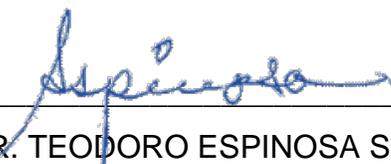
DR. BENITO REYES TREJO

CO-DIRECTOR



DR. HOLBER ZULETA PRADA

ASESOR:



DR. TEODORO ESPINOSA SOLARES

## Contenido

LISTA DE CUADROS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
ABREVIATURAS USADAS .....	vii
AGRADECIMIENTOS.....	viii
DEDICATORIAS.....	viii
DATOS BIBLIOGRÁFICOS .....	ix
RESUMEN GENERAL.....	1
GENERAL ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	5
2.1 Biomasa.....	5
2.1.1 Clasificación de la biomasa.....	6
2.2 Biomasa lignocelulósica .....	7
2.3 La lignina .....	10
2.3.1 Estructura de la lignina.....	10
2.3.2 Aislamiento y purificación de ligninas .....	14
2.3.3 Lignina Klason.....	18
2.3.4 Lignina Organosolv .....	19
2.3.5 Lignina Kraft .....	19
2.3.6 Análisis de las ligninas .....	20
2.3.7 Valorización lignina .....	21
2.3 Subproductos del cacao como fuente de material lignocelulósico.....	23
2.3.1 El cacao.....	23
2.3.2 Procesamiento del cacao .....	25
2.3.3 Cáscara de la mazorca del cacao (CMC) .....	27
2.3.4 Valorización de la CMC.....	27
2.3.4.1 Aplicaciones de bajo valor de la CMC .....	29
2.3.4.2 Aplicaciones actuales y potenciales de alto valor de la CMC y sus fracciones.....	31
2.4 Literatura citada.....	34

3 CUANTIFICACIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO DE CÁSCARA DE MAZORCA DE CACAO DE TRES VARIEDADES .....	47
3.1 Resumen .....	47
3.1 Introducción .....	49
3.4 Materiales y métodos .....	50
3.4.1 Material vegetal .....	50
3.4.2 Cuantificación de material lignocelulósico .....	52
3.4.3 Análisis estadístico.....	55
3.5 Resultados y discusión.....	55
3.5.1 Cuantificación del material lignocelulósico.....	55
3.5 Conclusión.....	58
3.6 Literatura citada.....	59
4 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LIGNINAS AISLADAS DE CASCARA DE LA MAZORCA DE CACAO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.....	62
4.1 Resumen .....	62
4.2 Introducción .....	64
4.3 Materiales y métodos .....	66
4.3.1 Material vegetal .....	66
4.3.2 Extracción de lignina insoluble en ácido (lignina Klason) .....	67
4.3.3 Extracción de lignina Organosolv por el método propuesto por Pereira et al., 2017.....	68
4.3.4 Extracción de lignina Organosolv por el método propuesto por Saha et al., 2019.....	68
4.3.5 Acetilación de ligninas klason .....	69
4.3.6 Análisis espectroscópico por FTIR-ATR .....	69
4.4 Resultados y discusión.....	70
4.4.1 Obtención de ligninas tipo Klason y Organosolv.....	70
4.4.2 Caracterización de las ligninas mediante FTIR.....	72
4.4.3 Caracterización de las ligninas klason acetiladas por FTIR.....	79
4.5 Conclusión.....	80
4.6 Literatura citada.....	81

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composiciones de componentes principales de algunos ejemplos de tipos de biomasa lignocelulósica .....	9
Cuadro 2. Proporción de los diferentes monolignoles en la lignina en distintos tipos de planta (Gellerstedt & Henriksson, 2008) .....	14
Cuadro 3. Comparación de diferentes procesos de aislamiento de lignina (Poveda et al., 2021).....	16
Cuadro 4. Producción mundial de grano de cacao (ICCO, 2022) .....	24
Cuadro 5. Composición química de la cáscara de la mazorca de cacao (g.100 g <sup>-1</sup> materia seca) adaptado de Vásquez et al. (2019) .....	28
Cuadro 6. Cuantificación del material lignocelulósico de tres distintas variedades de CMC.....	56
Cuadro 7. Composición química de CMC, comparación con trabajos previos..	58
Cuadro 8. Rendimiento de extracción de lignina de tres métodos diferentes en tres CMC de distintas variedades .....	71
Cuadro 9. Absorción IR de los componentes típicos de la lignina.....	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fuentes de biomasa más importantes .....	7
Figura 2. Principales componentes de biomasa lignocelulósica .....	8
Figura 3. Tipos de lignina en diversas plantas (A), Estructura de fenilpropanoide (B), precursores tipo monolignol y su aparición en la estructura de lignina (C) y otros monolignoles no- convencionales (D).....	11
Figura 4. Modelos representativos de estructuras de lignina para tres clases principales de plantas .....	13
Figura 5. Las estructuras del fruto del cacao.....	23
Figura 6. Variedades de cacao, a) Criollo, b) Forastero c) Trinitario .....	24
Figura 7. Estados productores de cacao en México.....	25
Figura 8. Diagrama de flujo de transformación del cacao en producto final y generación de subproductos .....	26
Figura 9. Proceso inicial de preparación de muestras de cascara de mazorca de cacao, obtención de material lignocelulósico seco y molido .....	51
Figura 10. Obtención de extraíbles de CMC. ....	52
Figura 11. Proceso de obtención de lignina .....	53
Figura 12. Estructura química de la lignina, modificado de Prieur et al., 2017. Los enlaces $\beta$ -O-4, $\beta$ -5 y $\beta$ - $\beta'$ están marcados en rojo (Zhang & Naebe, 2021)65	
Figura 1. Ligninas aisladas de CMC. a) Klason variedad caramelo, b) Organosolv Pereira variedad caramelo, c) Organosolv Saha variedad caramelo, d) Klason variedad forastero, e) Organosolv Pereira variedad forastero, f) Organosolv Saha variedad forastero, g) klason variedad trinitario, h) Organosolv Pereira variedad trinitario, i) Organosolv Saha variedad trinitario, k) lignina kraft, j) lignina Klason de aserrín de pino.....	72
Figura 14. Espectros completos de IR de las ligninas aisladas de CMC de distintas variedades, lignina de aserrín de madera de pino por el método Klason y lignina Kraft .....	74
Figura 15 Espectro completos de IR de las ligninas aisladas de CMC de distintas variedades por el método propuesto por Pereira et al., 2017.....	76
Figura 16. Espectro completos de IR de las ligninas aisladas de CMC de distintas variedades por el método propuesto por Saha et al., 2019.....	76
Figura 17. Espectros completos de IR de las ligninas aisladas de CMC por tres métodos de extracción de la variedad Carmelo.....	77
Figura 18. Espectros completos de IR de las ligninas aisladas de CMC por tres métodos de extracción de la variedad Forastero.....	78
Figura 19. Espectros completos de IR de las ligninas aisladas de CMC por tres métodos de extracción de la variedad Trinitario.....	78
Figura 20. Espectros completos de IR de las ligninas Klason acetiladas aisladas de CMC de tres variedades y aserrín de madera de pino.....	79

Figura 21. Reaccion de acetilación en las unidades estructurales de la lignina  
Klason de CMC. ....80

### ABREVIATURAS USADAS

ATR	Attenuated Total Reflection
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
cm <sup>-1</sup>	Centímetros a la -1, numero de onda
CPH	Cocoa Pod Husks
Hex	Hexano
IR	Infrarrojo
MeOH	Metanol
RMN	Resonancia Magnetica Nuclear
FT IR	Fourier Transform Infra Red

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo por la capacitación ofrecida y el apoyo en el uso de la infraestructura necesaria para el desarrollo del proyecto.

Al Drs. Benito Reyes Trejo, Holber Zuleta Prada, Teodoro Espinosa Solares, por su valioso tiempo, dedicación, capacitación y orientación durante el desarrollo de este proyecto.

## **DEDICATORIAS**

A los compañeros del Laboratorio de Productos Naturales Atenea, Edna, Guadalupe, Benjamín, Carlos, Jahaziel y Ulises.

A mis amigos Diego, Emilio, Oscar, Paco, Pancho y Rafa.

A mi Familia.

## DATOS BIBLIOGRÁFICOS



### Datos personales

Nombre: Sebastián García Fernández

Fecha de nacimiento: 21 de Julio de 1993

Lugar de nacimiento: Ciudad de México, México

No. Cartilla Militar:D-2016573

Cédula Profesional: 12359225

### Desarrollo Académico

Bachillerato: Escuela Nacional Preparatoria 5 “José Vasconcelos” UNAM

Licenciatura: Ingeniería Agroindustrial, UACH

## RESUMEN GENERAL

### CARACTERIZACIÓN DE LIGNINA EXTRAIDA DE LA CÁSCARA DE LA MAZORCA DE CACAO DE TRES VARIEDADES

En la industria del cacao se genera una gran cantidad de biomasa residual proveniente principalmente la cáscara de mazorca de cacao (CMC). Debido a la composición química de la CMC, esta se ha utilizado como fertilizante, biocombustible, entre otros. En la CMC, la lignina es el segundo componente mayoritario. La estructura polimérica aromática de la lignina la convierte en un material precursor para la obtención de compuestos de valor agregado. La compleja estructura de la lignina condiciona su aplicación final, esta varía dependiendo la fuente vegetal y el método de extracción. El objetivo de este trabajo fue cuantificar el material lignocelulósico de la CMC de las variedades carmelo, forastero y trinitario; y realizar estudios de caracterización estructural por espectroscopia de infrarrojo (FT-IR) de la lignina aislada de la CMC de las variedades antes mencionadas por tres métodos distintos de extracción. La variedad con mayor cantidad de extraíbles fue trinitario,  $24.7 \pm 0.78$ ; la variedad con mayor contenido de lignina fue forastero,  $26.3 \pm 0.56$ ; la variedad con mayor cantidad de celulosa fue forastero,  $28.7 \pm 0.05$ ; la cantidad de hemicelulosa en las tres variedades fue igual y la variedad con mayor cantidad de cenizas fue forastero,  $6.7 \pm 0.08$ . En cuanto a la caracterización mediante FT-IR, todas las ligninas muestran una banda ancha en  $3400-3260 \text{ cm}^{-1}$  atribuida a los grupos hidroxilos tipo fenólico y estructuras alifáticas. Las bandas centradas en  $2900$  y  $2800 \text{ cm}^{-1}$ , se asocian al estiramiento del CH de los grupos metoxilos aromáticos y de los grupos metil y metileno de las cadenas laterales, en la región del carbonilo/carboxilo, se encuentran bandas débiles en  $1680 \text{ cm}^{-1}$ , originadas por los sistemas conjugados. En las regiones de  $2300$ ,  $2000$ ,  $1400$ ,  $1200$ ,  $1000$  y  $800 \text{ cm}^{-1}$ , se encuentran señales características de los anillos de siringilo (S) y guayacol (G), confirmando estructuras lignínicas características de maderas duras

**Palabras clave:** CMC, lignocelulosa, lignina, RMN, FTIR

## GENERAL ABSTRACT

### CHARACTERIZATION OF LIGNIN EXTRACTED FROM THE COCOA POD HUSK OF THREE COCOA VARIETIES

In the cocoa industry, a large amount of residual biomass is generated, mainly from the cocoa pod husk (CPH). Due to the chemical composition of CPH, it has been used as fertilizer, biofuel, among others. In CPH, lignin is the second major component. The aromatic polymeric structure of lignin makes it a precursor material for obtaining value-added compounds. The complex structure of lignin determines its final application, which varies depending on the plant source and the extraction method. The objective of this work was to quantify the lignocellulosic material of the CPH of the carmelo, forastero and trinitario varieties; and to carry out structural characterization studies by infrared spectroscopy (FT-IR) of the lignin isolated from the CPH of the aforementioned varieties by three different extraction methods. The variety with the highest amount of extractables was trinitario,  $24.7 \pm 0.78$ ; the variety with the highest lignin content was forastero,  $26.3 \pm 0.56$ ; the variety with the highest amount of cellulose was forastero,  $28.7 \pm 0.05$ ; the amount of hemicellulose in the three varieties was equal and the variety with the highest amount of ash was forastero,  $6.7 \pm 0.08$ . Regarding FT-IR characterization, all lignins show a broad band at  $3400\text{-}3260\text{ cm}^{-1}$  attributed to phenolic-type hydroxyl groups and aliphatic structures. The bands centered at  $2900$  and  $2800\text{ cm}^{-1}$ , are associated with CH stretching of the aromatic methoxyl groups and the methyl and methylene groups of the side chains, in the carbonyl/carboxyl region, weak bands are found at  $1680\text{ cm}^{-1}$ , originating from conjugated systems. In the  $2300$ ,  $2000$ ,  $1400$ ,  $1200$ ,  $1000$  and  $800\text{ cm}^{-1}$  regions, signals characteristic of syringyl (S) and guaiacol (G) rings are found, confirming ligninic structures characteristic of hardwoods.

**Key words:** CPH, lignocellulose, FTIR, lignin, characterization

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El rápido agotamiento de las reservas de energía fósil, los problemas derivados del cambio climático por la emisión de gases efecto invernadero, la destrucción del suelo, la seguridad energética, la seguridad alimentaria y del agua, son desafíos de atención prioritaria global. En años recientes, muchos países se han comprometido a desarrollar y utilizar energías renovables (Liu & Yu, 2021), las estrategias consisten principalmente en reducir y sustituir los recursos fósiles, por materias primas de suministro renovable y encaminarse hacia una economía sostenible de base biológica (Donia et al., 2018). En este sentido, es imprescindible converger hacia una producción de combustibles, productos químicos, polímeros y materiales a partir de materias primas biodisponibles sostenibles (Krüger et al., 2018). En este contexto, la biomasa lignocelulósica, emerge como una materia prima esencial, dada su renovabilidad biológica, buena disponibilidad y abundantes reservas (van Swaaij et al., 2015, Boro et al., 2022).

Desde un punto de vista estructural, las características constitutivas de la biomasa lignocelulosa; consta principalmente de celulosa (35–50%), hemicelulosa (25–30%) y lignina (15–30%); la cantidad relativa de cada componente estructural depende de la especie. Este conjunto de biopolímeros, conforman una matriz porosa microestructurada tridimensional, la cual proporciona rigidez a la pared celular de la planta (Madanayake et al., 2017). Para acceder a los biopolímeros y sus unidades o subunidades constituyentes, es inevitable el trabajo de pretratamiento y tratamiento de la biomasa. Existen múltiples metodologías y combinaciones de ellas (Agbor et al., 2011), y su aplicación depende de los tipos de productos objetivo (Mankar et al., 2021). Por ejemplo, en las biorrefinerías los productos de interés son los de gran importancia comercial, destacándose principalmente: los biocombustibles (biogás, Syngas, hidrógeno, biometano, bioetanol y biodiesel), productos químicos (disolventes, productos químicos a granel, compuestos bioactivos y moléculas plataforma),

ácidos orgánicos (succínicos, lácticos), polímeros y resinas (plásticos a base de almidón, resinas fenólicas y resinas de furano), biomateriales (paneles de madera, pulpa, papel y celulosa), alimentos, comida para animales y fertilizantes (Budzianowski, 2016). Ante la demanda de insumos renovables, los desechos agroindustriales se convierten en una fuente atractiva y constante para suplir esas necesidades. Uno de los residuos lignocelulósicos, que ha llamado la atención en los últimos años es la cáscara de la mazorca de cacao (CMC), o conocida en inglés como Cocoa Pod Husk (CPH). Este material, hace parte de otros sub-productos en la cadena de producción del cacao, la cual ha aumentado en los últimos años (Statista, 2021); los cuales en conjunto representan el 67-76% del peso seco y por cada tonelada de grano de cacao producido se genera aproximadamente 10 toneladas de CMC húmeda, con un contenido de humedad de aproximado de 80% (Campos et al., 2018).

En cuanto a la composición de la estructura de la CMC recién cosechada, tiene por lo general la siguiente composición porcentual: materia orgánica 87% (proteína cruda, fibra, grasas y nitrógeno libre 8.4, 55.7, 2.5 y 20.6% respectivamente), hemicelulosa 8.9%, celulosa 35.3% y lignina %25.2% (de Souza et al., 2022). Este material, ha sido estudiado, analizado y evaluado para la fabricación de algunos componentes útiles y de valor añadido, por ejemplo: extracto de pectina, fibra dietética, nanopartículas de plata, cetonas, fenoles, entre otros (Yapo et al., 2013; Mansur et al., 2014; Lateef et al., 2016; Lu et al., 2018; Baidoo et al., 2022., Valladares-Diestra et al., 2022., Dewi et al., 2022).

Dentro del arsenal de opciones que ofrece la biomasa lignocelulósica, para la obtención de productos de alto valor; la lignina aparece en un escenario particular. Este interesante biopolímero lignocelulósico, posee dos características particulares, la primera es el gran volumen de material lignocelulósico que ofrece y la segunda corresponde a la estructura polimérica aromática, única en el material lignocelulósico. La extracción de lignina del resto de la biomasa ha recibido una atención creciente y su potencial uso es promisorio (Bertella & Luterbacher, 2020; Borges Gomes et al., 2020). La lignina se ha utilizado

ampliamente en la fabricación de materiales poliméricos para múltiples utilidades (Naegele et al., 2016), biocombustibles (Chakravarty et al., 2022), fibras de carbono (Gbenebor & Adeosun, 2019), biomateriales de grafeno (Liu et al., 2017), carbón activado (Bergna et al., 2022), agricultura y construcción (Ayyachamy et al., 2013), también se ha producido gasolina renovable a partir de la lignina como materia prima (Ben et al., 2013), además, se ha demostrado que la lignina tiene amplias aplicaciones farmacéuticas como: anticancerígenos, antiinflamatorios, prebióticos, antibióticos y antimicrobianos (Nan et al., 2022). Las propiedades y usos diversos de este recurso, radica en el tipo de lignina y el material lignocelulósico de origen (Sun R. , 2020), por ello es indispensable conocimiento exhaustivo de su estructura para aumentar su valor añadido (Pin et al., 2020) esto sólo es posible por medio de varias técnicas analíticas (Stark et al., 2016).

En vista de lo anterior, en este trabajo se planteó determinar el contenido lignocelulósico de las cáscaras de mazorca de cacao de tres variedades diferentes obtenidas en la región de Tabasco México. Adicionalmente, se hicieron estudios por espectroscopía de Infrarojo, para determinar perfiles estructurales de la lignina en función de los grupos funcionales, asociadas al tipo y origen vegetal. Además, los resultados de este trabajo promoverán el aprovechamiento de la cascara de mazorca de cacao producida en México; como fuente de lignina para aplicaciones a nivel industrial, además de contribuir en aspectos de desarrollo social, económico, ambiental en las regiones productoras.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Biomasa**

La biomasa es la mayor fuente de energía renovable en el mundo actual que puede utilizarse como combustible y productos que, de otro modo, se fabricarían con recursos fósiles. La biomasa se considera como la materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como

fuentes de energía. Desde las últimas décadas del siglo veinte existe un importante esfuerzo por impulsar el uso de nuevas materias primas como alternativa al petróleo y sus derivados, debido a los problemas de escasez de reservas y las numerosas desventajas medioambientales que genera el uso de estos recursos fósiles a los niveles actuales. La utilización de biomasa para biocombustibles es un proceso casi neutro en carbono. A diferencia de los combustibles fósiles, como la gasolina, el gasóleo y el carbón, los biocombustibles se consideran una fuente de energía limpia que tiene bajas emisiones. Así, el uso sostenible de la biomasa para la energía puede ser beneficioso para mantener el control del calentamiento global. Dado que la biomasa es una fuente renovable de energía, la investigación actual se enfoca en la búsqueda de mecanismos diversos para mejorar la obtención de biocombustibles para fuentes de energía alternativas (Kothari et al., 2022).

### **2.1.1 Clasificación de la biomasa**

Debido a las diferencias sustanciales en términos de variedad y cantidad de biomasa, y a sus diferentes características de composición, no existe una forma unívoca de clasificación de la biomasa, por lo que se pueden agrupar de forma diferente, dependiendo de su finalidad y alcance (Tursi, 2019).

Los recursos biomásicos pueden agruparse de forma general en agrícolas y forestales (residuos de la industria de transformación de la madera como virutas, serrín, etc.), en residuos animales (explotaciones ganaderas), aguas residuales, las algas y los cultivos acuáticos. Los residuos sólidos urbanos y los flujos de residuos procedentes de actividades antropogénicas también entran en la categoría de la biomasa (Figura 1).

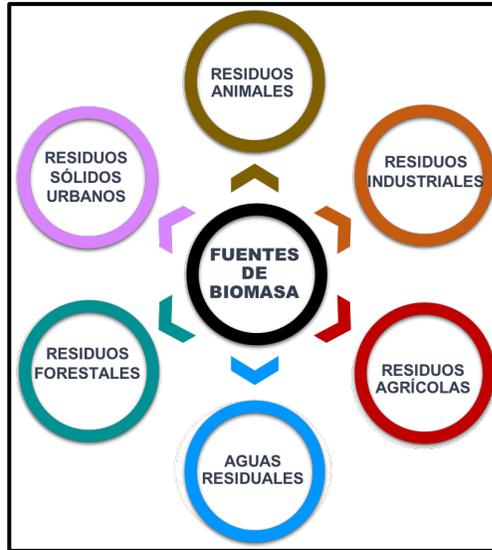


Figura 2. Fuentes de biomasa más importantes

## 2.2 Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica se compone en orden decreciente de masa de diferentes polímeros como los polisacáridos (celulosa y hemicelulosa), lignina que es un polímero aromático, junto con sustancias no polares y polares que se entrelazan entre sí (Chen et al., 2017; Yu et al., 2017). Estructuralmente, los distintos tipos de biomasa lignocelulósica tienen un aspecto físico y una resistencia distintos (Kumar et al., 2020; Varejão et al., 2022), los compuestos lignocelulósicos se encuentran fuertemente asociados entre sí, la celulosa forma un esqueleto que está rodeado de hemicelulosa y lignina (Figura 2).

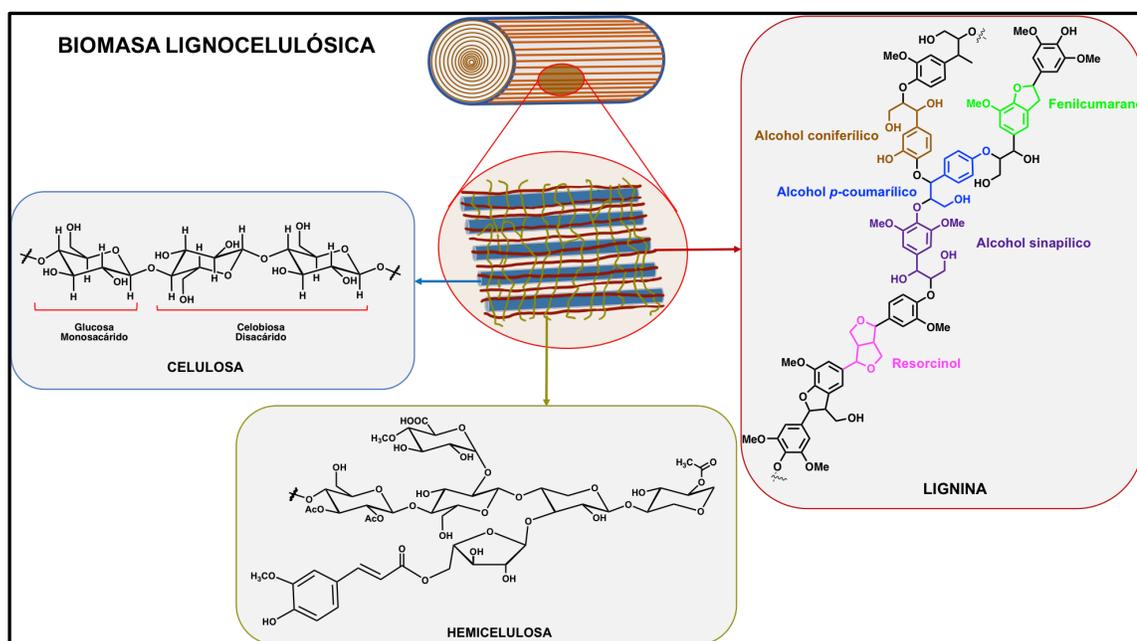


Figura 3. Principales componentes de biomasa lignocelulósica

Algunos tipos de lignocelulosa pueden tener otros componentes secundarios importantes en menor proporción, como las pectinas, lípidos, terpenos, azúcares, clorofila, gomas, ácidos grasos, resinas, diferentes sustancias fenólicas y cenizas, es decir, minerales extraíbles ricos en Ca, K, Mg y Si.

Por otro lado, como recurso vegetal la biomasa lignocelulósica puede dividirse en cuatro categorías: madera dura, madera blanda, residuos de la actividad agrícola y hierbas (Cuadro 1). Los diferentes tipos comunes de biomasa muestran composiciones químicas diferentes en cuanto a cada uno de los tres constituyentes principales.

A pesar de que los residuos agrícolas se producen en cantidades muy grandes (miles de millones de toneladas) cada año en todo el mundo, la mayoría de estos residuos se desechan o se queman (Isikgor & Becer, 2015).

Cuadro 1. Composiciones de componentes principales de algunos ejemplos de tipos de biomasa lignocelulósica

Biomasa Lignocelulósica		Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Madera Dura	Roble	40.4	25.9	24.1
	Eucalipto	54.1	18.4	21.5
Madera Blanda	Pino	42.0-50.0	24.0-27.0	20.0
	Pino Silvestre	40.0	28.5	27.7
Residuos Agrícolas	Paja de Trigo	35.0-30.0	23.0-30.0	12.0-16.0
	Cáscara de Cebada	34.0	36.0	13.8-19.0
	Paja de Cebada	36.0-43.0	24.0-33.0	6.3-9.8
	Paja de Arroz	29.2-34.7	23.0-25.9	17.0-19.0
	Cáscara de Arroz	28.7-35.6	12.0-29.3	15.4-20.0
	Paja de Avena	31.0-35.0	20.0-26.0	10.0-15.0
	Paja de Pasto	36.2-47.0	19.0-24.5	9.9-24.0
	Mazorca de Maíz	33.7-41.2	31.9-36.0	6.1-15.9
	Tallos de Maíz	35.0-39.6	16.8-35.0	7.0-18.4

Otros materiales lignocelulósicos como residuos alimentarios, pueden recuperarse o reciclarse ya sea por razones económicas o medioambientales, también se pueden valorizar como subproductos. La biotecnología y el bioprocesamiento ofrecen importantes alternativas para el uso de los residuos biodegradables como materia prima en nuevos procesos, mediante la bioconversión de sus moléculas constitutivas, que son una rica fuente de energía, carbono y nutrientes, en nuevos productos (Woiciechowski et al., 2020) Tanto la hemicelulosa como la celulosa son polímeros de carbohidratos en su naturaleza, cuando se considera su porcentaje total, se pueden encontrar valores tan altos como el 70-80% de la materia seca en las muestras de biomasa. El otro polímero distinto de componentes aromáticos es la lignina, que en este trabajo se considera en un capítulo especial.

## 2.3 La lignina

La lignina es uno de los biopolímeros más abundantes en el mundo vegetal después de la celulosa y hemicelulosa. De manera general, se puede afirmar que es una sustancia de naturaleza esencialmente hidrofóbica y de difícil extracción de la biomasa lignocelulósica. La lignina es la fracción más pequeña de los tres componentes principales de la biomasa, alcanzando del orden del 10-30% (p/p). Debido a su estructura rica en anillos aromáticos relacionados con los fenoles, constituye el polímero de naturaleza aromática más abundante que se encuentra en la naturaleza. La extrema complejidad y la variada diversidad estructural en diferentes tejidos y especies vegetales, así como también su modificación durante el procedimiento de extracción, ha complicado establecer una estructura exacta de la lignina (Lourenço & Pereira, 2017). A pesar de ello, los estudios sobre ligninas, sus rutas biosintéticas, metabolismo, el uso de modernos equipos de análisis y a los nuevos métodos desarrollados, han permitido obtener mas informacion de las principales estructuras de la lignina, lo que ha refinado cada vez más el conocimiento de la estructura de la lignina (Ralph et al., 2019). Debido a la potencial aplicación de la lignina como biorrecurso renovable y como fuente de compuestos aromáticos, en los últimos años la lignina ha recibido mucha atención por parte la comunidad científica y la industria (Sharma & Kumar, 2020). La valorización de la lignina es una parte importante de los futuros aprovechamientos, lo que requiere tener un conocimiento claro y preciso de su estructura química.

### 2.3.1 Estructura de la lignina

La lignina es un complejo biopolímero aromático heterogéneo, que difieren en su estructura según el tipo de planta (Figura 3A). Estas estructuras están construidas por la polimerización de los alcoholes cinamílicos (monolignoles), provenientes de precursores tipo fenilpropanoide (Figura 3B). Desde un punto de vista biosintético los monómeros vinil-fenólicos, se polimerizan catalizados por diferentes enzimas a partir de los alcoholes precursores: *p*-cumarilo, coniferilo y

sinapilo (Figura 3c). Dependiendo de la fuente, la lignina tiene una estructura ligeramente diferente, en biomasa de fibras largas es más rica en alcohol coniferílico (aproximadamente el 90%), mientras que la lignina de la hierba es más rica en fracciones cumáricas, y las maderas duras son abundantes en alcoholes sinapílicos (Lu et al., 2017).

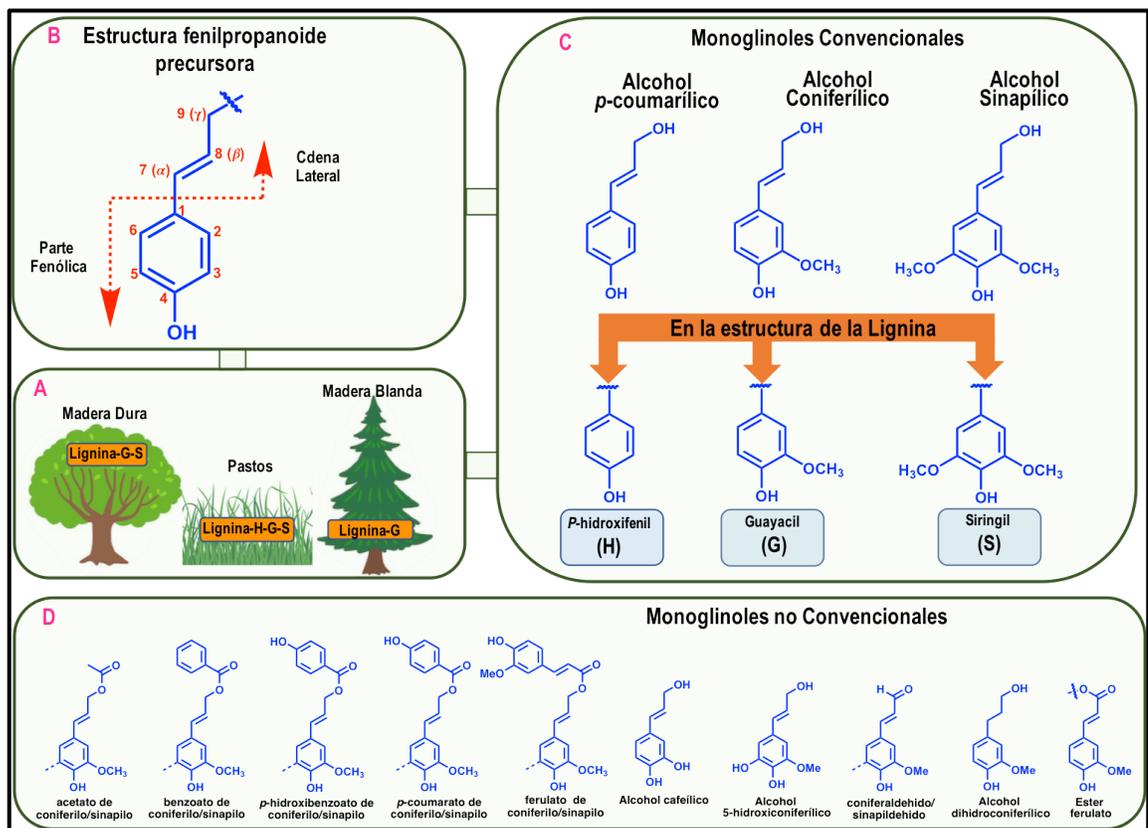


Figura 4. Tipos de lignina en diversas plantas (A), Estructura de fenilpropanoide (B), precursores tipo monoglignol y su aparición en la estructura de lignina (C) y otros monoglignoles no-convencionales (D)

La lignina es una macromolécula compleja, cuya construcción a partir de la polimerización ocurre por distintas reacciones (condensación, radicales libres, etc.) a nivel enzimático, a partir de alcoholes p-cumarílico, coniferílico y sinapílico. Estos alcoholes son la base de la estructura primaria de la lignina, formando monoglignoles que se denominan unidades de p-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S), respectivamente (Figura 3C). Estas unidades se distribuyen en proporciones variables en el reino vegetal. La diversidad estructural de la lignina

radica en que estas unidades estructurales no suelen repetirse de forma regular y la composición y estructura de la lignina varían dependiendo de su origen.

De manera general, las unidades de la lignina están unidas entre sí mediante varios tipos de enlaces éter (R-O-R) y carbono-carbono (C-C). En la Figura 3, se muestran modelos de estructuras de lignina para: (A) una gimnosperma/madera blanda, (B) una angiosperma/dicotiledónea/madera dura y (C) una (monocotiledónea/hierbas). En este interesante trabajo de Ralph y colaboradores (2019) intentan representar las diversas unidades con información analítica actual. En la estructura de madera blanda en (A), la lignina está formada casi exclusivamente por alcohol coniferílico (unidades G-guayacilo), con pequeñas cantidades menores de otras unidades especiales como: una espirodienona F, unidades del grupo final de alcohol cinámico X, fenilcumaranos B, Resinol C, Difenil éter E y una interesante estructura Dibenzodioxin D.

En las maderas duras, el bloque de construcción cambia drásticamente a unidades del alcohol sinapílico (unidades S, singirilo) mezcladas con unidades G. Se encuentran distribuidos también en el modelo, una cadena inicial de alcohol cinámico X, un Resinol C, difenileter E, también se muestran p-hidroxibenzoatos pBA. En el caso de las monocotiledóneas, la lignina contiene unidades monoméricas S y G con una unidad ferulada FA, no se detectaron unidades del grupo final de alcohol cinámico X. También se observan unidades de: Fenilcumaranos B, un Tetrahidrofurano C', Bifenil éter E, además de p-cumaratos pCA.

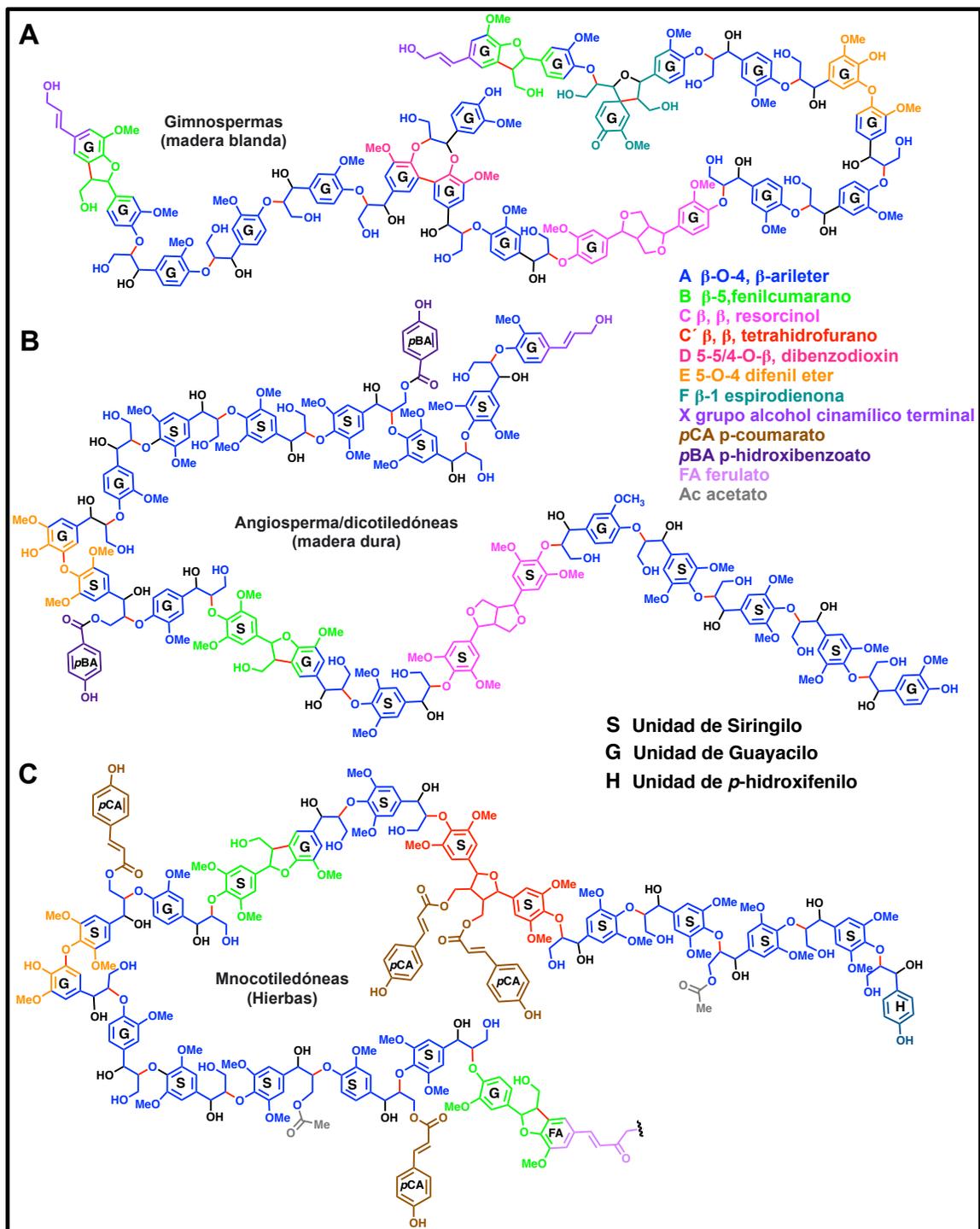


Figura 5. Modelos representativos de estructuras de lignina para tres clases principales de plantas

Es importante mencionar la proporción de los mognolinol constituyentes de la lignina, algunos trabajos han presentado estos valores y la ocurrencia de cada unidad en cada tipo de planta (Cuadro 2)

Cuadro 2. Proporción de los diferentes monolignoles en la lignina en distintos tipos de planta (Gellerstedt & Henriksson, 2008)

Tipo de planta	Alcohol <i>p</i> - cumarílico	Alcohol coniferílico	Alcohol sinapílico
	%		
Coníferas; Madera blanda	< 5 <sup>a</sup>	>95	0 <sup>b</sup>
Eudicotiledóneas; maderas duras	0-8	25-50	45-75
Monocotiledóneas; hierbas (gramíneas)	5-35	35-80	20-55

<sup>a</sup> Mayor cantidad en la madera de compresión

<sup>b</sup> Existen algunas excepciones (Chen, 1992)

Es comprensible la dificultad para establecer estructuras precisas de la lignina, sin embargo, estos modelos basados en análisis biosintéticos, espectroscópicos, químicos etc., han permitido valorizar la lignina como materia prima química para productos básicos para una industria que algún día no tendrá más remedio que utilizar fuentes de energía renovable y sostenible, neutral en carbono. Las diversas estructuras de las ligninas y las posibles transformaciones en cada uno de los grupos funcionales activos, pueden ser capitalizados por métodos químicos y biotecnológicos, colocando a las ligninas como polímeros recalcitrantes problemáticos a recursos con potencial ilimitado.

### 2.3.2 Aislamiento y purificación de ligninas

En general, la matriz estructural de la lignocelulosa es una red compleja donde la celulosa está cubierta por una monocapa de hemicelulosa y luego se incrusta en el núcleo interno de la matriz de lignina y hemicelulosa. Por lo tanto, la separación de los diferentes componentes de este material plantea varias limitaciones, lo que motiva investigadores a avanzar en la investigación en este

campo. Particularmente, la extracción de lignina de la biomasa ha recibido una atención creciente por su abundancia y aplicaciones (Bertella y Luterbacher, 2020). La lignina es difícil de degradar ya que es poco reactiva, por lo que representa un obstáculo para la valorización de la biomasa. Siempre ha sido un reto aislar muestras de lignina óptimas para los análisis composicionales y estructurales (Lai & Sarkanen, 1971; Obst & Kirk, 1988). Se han utilizado diversos tratamientos para extraer lignina, como: mecánicos, químicos y el tratamiento biológico (Lobato-Peralta et al., 2021). Los métodos se pueden clasificar en dos categorías particulares, a saber, los procesos con y sin azufre. (Rajesh Banu et al., 2019). El método de extracción depende del precursor y su composición y el rendimiento, la pureza y la estructura final están influenciados por el tipo de método, el disolvente, la temperatura y el tiempo. En la mayoría de los casos, la extracción altera su estructura original, debido a la compleja arquitectura en la matriz de los componentes de la biomasa. A pesar de numerosos estudios para el aislamiento de la lignina, ninguno de los métodos actuales ofrece un procedimiento ideal de recuperación de la lignina cuantitativamente, sin contaminantes no lignínicos y sin modificaciones químicas (Dence & Lin, 1992). Hoy día, los esfuerzos de investigación se han centrado en el aislamiento ecológico de polímeros de lignina con estructuras originales más conservadas utilizando disolventes eutécticos profundos (Chen et al., 2020) o mediante el fraccionamiento hidrotópico de flujo a presión atmosférica (Wang et al., 2019). Existe un consenso en que los diferentes métodos de extracción dan como resultado diferente estructura química de la lignina extraída e influye en gran medida en la reactividad para posteriores modificaciones y aplicaciones (Suota et al., 2021). El proceso de deslignificación puede realizarse mediante diferentes métodos de extracción como se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Comparación de diferentes procesos de aislamiento de lignina (Poveda et al., 2021)

Tipo de extracción	Resumen del proceso	Ventajas	Desventajas	Referencias
Proceso Kraft	-Nombre de lignina: Lignina Kraft -Tratamiento hidrolítico con NaOH y Na <sub>2</sub> S - Temperatura: 150-180 °C - Lignina de peso molecular moderado (1000–3000 Da)	- Implementado principalmente para materiales de madera. - El mejor tratamiento de eliminación de lignina - Lignina con un pequeño contenido de ceniza - Lignina soluble en disoluciones alcalinas y disolventes orgánicos (polares)	- Contenido moderado de azufre - Licor negro con alto contenido en carbohidratos - Tratamientos de larga duración (1–2 h)	(Tolbert et al., 2014) (Carvajal et al., 2016)
Sulfito	Nombre: lignina lignosulfonato - Tratamiento hidrolítico con NaOH y Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> - Temperatura: 120–180 °C - Lignina de alto peso molecular (5700–61000 Da)	Implementado principalmente para biomasa de madera - Lignina soluble en agua - Soluble en disolventes orgánicos polares y aminas	- Alto contenido de azufre - No selectivo para la extracción de lignina. Tanto la hemicelulosa y la lignina se extraen - Alto contenido de cenizas (4–8%) - Alto contenido en carbohidratos	(Borges Gomes et al., 2020) (Chávez-Sifontes & Domine, 2013)
Klason	- Nombre: lignina Klason - Hidrólisis ácida concentrada con 72% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - Temperatura: 30 °C - Lignina de peso molecular moderado (2000–7000 Da)	- El método estándar para la lignina cuantificación - Aislamiento de alto rendimiento - Bajo contenido en carbohidratos - Un método analítico, no a escala industrial	- Un método analítico, no a escala industrial - Alto cambio de estructura de lignina - El alto costo del ácido. - Corrosión severa del equipo	(Li et al., 2015) (Chen et al., 2015)
Soda	Nombre: lignina tipo sosa - Tratamiento alcalino hidrolítico con NaOH - Temperatura: 90–150 °C - Lignina de bajo peso molecular (1000–3000 Da)	- Contenido libre de azufre - Baja formación de compuestos inhibitorios - Implementado principalmente para productos no madereros materiales - Bajo contenido en cenizas (<2,8%)	- Costo representativo del agente alcalino - Alta alteración en la estructura de la lignina - Alto contenido de carbohidratos a temperaturas superiores 120 °C - Alto consumo de agente alcalino	(Carvajal et al., 2016). (Lehto & Alén, 2014)
Organosolv	Nombre: lignina organosolv - Tratamiento hidrotérmico con disolvente	- Contenido libre de azufre - Baja alteración en la estructura de la lignina nativa - Lignina de bajo peso molecular	- Alto costo de disolvente - Requiere una etapa adicional para la recuperación de disolventes - Lignina hidrófoba	(Behling et al., 2016) (Ahmad & Pant, 2018)

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentración de disolvente: 25–75 % (vol.)</li> <li>- Temperatura: 90–210 °C</li> <li>- Lignina de peso molecular moderado (3000–4500 Da)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Soluble en soluciones alcalinas</li> <li>- Tiempos de funcionamiento relativamente bajos (&lt;1,5 h)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Escala de producción piloto/demo</li> </ul>	
Explosión de vapor	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nombre: lignina explotada con vapor</li> <li>- Tratamiento hidrotérmico</li> <li>- Temperatura: 180–230 °C</li> <li>- Presión: 1,3–3,5 MPa</li> <li>- Lignina de bajo peso molecular (1000–3000 Da)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contenido libre de azufre</li> <li>- Requisito de entrada de reactivos bajo o nulo</li> <li>- Tiempo de proceso reducido</li> <li>- Bajo requerimiento de energía</li> <li>- Bajo contenido en cenizas (&lt;4%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cambios en la lignina media en comparación con la forma nativa</li> <li>- Aislamiento de carbohidratos en la fracción de licor (7–20 %)</li> <li>- Alto contenido en hemicelulosa</li> </ul>	(Chen et al., 2015) (Ahmad & Pant, 2018)
Enzimática	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nombre: lignina enzimática</li> <li>- Tratamiento biológico</li> <li>- Temperatura: 20–45 °C</li> <li>- Bio-reactivo: hongos y bacterias</li> <li>- Lignina de peso molecular medio (4500–9500 Da)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lignina libre de azufre</li> <li>- Procesos no intensivos en energía</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Largos tiempos de residencia (varias horas o días)</li> <li>- Consumo de carbohidratos de cultivo microbiano</li> </ul>	(Tolbert et al., 2014) (Sindhu et al., 2016)
Líquidos iónicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fraccionamiento de disolventes hidrotermales</li> <li>- Temperatura: 100–170 °C</li> <li>- Lignina de peso molecular medio (1500–5000 Da)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contenido libre de azufre</li> <li>- Bajo cambio de estructura de lignina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- El alto costo del líquido iónico</li> <li>- Adición de un antidisolvente a la regeneración de biomasa</li> <li>- Interferencias entre el líquido iónico residual y el actividad enzimática y microbiana</li> <li>- Requiere una etapa adicional para la recuperación del líquido iónico</li> </ul>	(Yinghuai et al., 2013)

Los procesos de aislamiento de la lignina y las metodologías de fraccionamiento actuales pueden clasificarse en función de diferentes principios. Según el principio de separación, los procesos de aislamiento de la lignina pueden dividirse en dos categorías: 1) La lignina que se extrae con diferentes disolventes y disoluciones de la biomasa lignocelulósica y se obtiene un residuo rico en celulosa deslignificada. La mayoría de los métodos de aislamiento de la lignina

entran en esta categoría. 2) Métodos que degradan o disuelven los carbohidratos de la biomasa lignocelulósica, dando lugar a una lignina residual, como la lignina de Klason y la lignina residual tras el tratamiento con celulasa. Paralelamente, según el propósito del aislamiento de la lignina, ésta también puede dividirse en dos categorías 1) aislamiento de lignina para la caracterización estructural y 2) aislamiento de lignina de diferentes procesos industriales y de pretratamiento para su utilización final (Ragauskas et al.,2014). En las siguientes secciones se describe brevemente algunos métodos seleccionados de aislamiento de lignina.

### **2.3.3 Lignina Klason**

Probablemente, la lignina aislada más conocida es la lignina Klason, método desarrollado originalmente para medir la cantidad de lignina en la madera (Adams, 1965), la cual se obtiene tratando la madera con ácido sulfúrico, los polisacáridos se hidrolizan hasta convertirse en azúcares solubles en agua, y la lignina se recupera como residuo insoluble. Aunque este método de aislamiento de la lignina tiene una gran utilidad como medio analítico para determinar el contenido de lignina, esta al estar altamente condensada y alterada, no suele ser adecuada ni para la caracterización química ni para los estudios de modificación y degradación biológica. Para tales estudios, lo que se necesita es una lignina aislada que sea representativa de la lignina de la lignocelulosa original (que a veces se denomina protolignina) (Obst & Kirk, 1988). Además, se sabe que el método Klason sobrestima el contenido de lignina en otros materiales vegetales, como las hierbas forrajeras. También hay fuertes indicios de que el método Klason no mide con precisión el contenido de lignina en productos alimentarios como los granos de cereales, las frutas y las verduras (Bunzel, Schüßler, & Tchetsseubu, 2011).

### **2.3.4 Lignina Organosolv**

El método Organosolv implica la cocción de la biomasa lignocelulósica en una mezcla de agua con un disolvente orgánico que conduce a la deconstrucción tanto de la lignina como de la hemicelulosa y su disolución en el licor de cocción (McDonough, 1993). En este proceso se pueden utilizar diversos disolventes orgánicos, como alcoholes (metanol, etanol, butanol), cetonas (acetona), éteres (dioxano, alcohol tetrahidrofurfurílico) y polioles (glicerol, etilenglicol) para disolver y liberar las hemicelulosas y la lignina (Liao et al., 2020), también, ácidos y bases son frecuentemente utilizados como catalizadores, aunque los métodos sin catalizador utilizan a una temperatura relativamente más alta (Løhre et al., 2018).

Debido a que se obtiene con un proceso menos agresivo, la lignina Organosolv se diferencia de otros tipos de lignina proporcionados por los métodos químicos convencionales (de la Torre et al., 2013). Este procedimiento también produce una gran cantidad de lignina de alta calidad que es relativamente pura, principalmente inalterada y menos condensada que otras ligninas. La lignina organosolv es soluble en muchos disolventes orgánicos (Pereira et al. 2017; Saha et al. 2019) y podría encontrar aplicaciones en muchos campos a nivel industrial.

### **2.3.5 Lignina Kraft**

El protocolo para obtención de lignina denominado Kraft, es el medio para generar la mayor parte de la pulpa de papel en el planeta. La biomasa es tratada con una disolución mixta de  $\text{Na}_2\text{S}/\text{NaOH}$  (licor blanco) a alta temperatura (155-175 °C) y alta presión durante varias horas (Lachenal, 2016). En este proceso, ocurren varias reacciones de despolimerización que generan diversos fragmentos fenólicos. Entre el 90-95% de toda la lignina presente en la biomasa puede disolverse en la disolución. El líquido resultante llamado licor negro, es rico en lignina. El uso de una disolución ácida fuerte, promueve la precipitación de la

lignina sulfonada (Kraft), en este caso dos terceras partes se convierten en su forma sulfatada. Por lo tanto, la lignina Kraft puede disolverse en disoluciones básicas y en disolventes orgánicos altamente polares. La masa molar de la lignina Kraft está en el rango de 1000-3000 Dalton. Al contrario de la Lignina Klason y Organosolv, la lignina Kraft es muy usada como combustible en la generación de energía para las fábricas de pulpa de papel (Gordobil et al., 2021; Vishtal & Kraslawski, 2011), pero es rara vez usada en aplicaciones de valor añadido, como la preparación de productos químicos finos y materiales avanzados. Estas dificultades están asociadas a la naturaleza altamente compleja y condensada de esta, que la hace una lignina altamente recalcitrante, y una elevada polidispersidad, además de una considerable cantidad de azufre (Rinaldi et al., 2016). A pesar de lo anterior, se han realizado muchos esfuerzos para desarrollar productos de alto valor añadido a partir de la lignina Kraft, ejemplos de ellos son: resinas y aglutinantes (Cadvar et al., 2008), carbones activados y materiales fibrosos (Thielemans et al., 2001) y algunos productos químicos de bajo peso molecular (vainillina, aromáticos hidroxilados y quinonas) (Borges et al., 2009).

### **2.3.6 Análisis de las ligninas**

Los métodos tradicionales para estudiar la estructura química de la lignina, son principalmente químicos, estos incluyen reacciones de oxidación-reducción, hidrólisis, derivatización; las cuales permiten de manera general identificar fragmentos monoméricos y poliméricos de la estructura de la lignina (Lourenço & Pereira, 2017; Dou et al., 2018). Sin embargo, estos métodos químicos no pueden proporcionar una caracterización estructural completa de la lignina dada la variabilidad estructural y la complejidad de los polímeros constituyentes. Por lo tanto, las estrategias analíticas actuales se basa en métodos instrumentales, como: la pirolisis, análisis por sistemas acoplados cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM) y Cromatografía líquida, también acoplada a masas (CL-EM), además de Cromatografía de exclusión por tamaño. Un número de estrategias basadas en métodos espectroscópicos, han tenido un importante

aporte en los últimos años, en la caracterización de la estructura química de la lignina. Algunos métodos tanto degradativos como no degradativos se emplean en función de los objetivos de la determinación y de las técnicas utilizadas en el análisis, teniendo como ventaja la capacidad para analizar toda la estructura de la lignina y detectar directamente los restos de lignina.

Los métodos espectroscópicos son los más utilizados para la elucidación estructural de lignina tanto en estado sólido como en disolución, incluyen: la espectroscopia ultravioleta (UV), la espectroscopia infrarroja (IR), específicamente la espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR), varios métodos de resonancia magnética nuclear (RMN). Para dilucidar las características químicas detalladas y completas de la lignina, es indispensable la información de determinadas muestras, que consideran el origen vegetal de la muestra, la proporción y la distribución de los bloques de construcción (unidades, monolignoles o monómeros) y los enlaces intermoleculares. Lo anterior se menciona debido a que algunas técnicas instrumentales sólo proporcionan parcialmente información de la muestra de lignina debido a su limitado rango de detección (Faleva et al., 2020). El análisis y comprensión de las características estructurales específicas de la lignina permite desarrollar tecnologías de tecnología de conversión eficiente y económica de productos de mediano y alto valor en modelos en los cuales se requiere de recursos lignocelulósicos; como es el caso de las biorrefinerías (Xu et al., 2019).

### **2.3.7 Valorización lignina**

La lignina constituye el biopolímero aromático más abundante del planeta procedente de recursos renovables, se ha estimado que existen aproximadamente 31,011 toneladas métricas de lignina en la tierra. A nivel industrial, tras el fraccionamiento de la biomasa lignocelulósica para la fabricación de papel, la lignina se considera como un residuo de bajo valor. En realidad, más de 50 millones de toneladas de lignina se utilizan para la generación de electricidad mediante combustión y un bajo porcentaje se utiliza

en otras aplicaciones (Sethupathy et al., 2022). La característica aromática de este biopolímero revela un alto potencial para producir varias sustancias químicas y biocombustibles de interés a través de actividades de biorrefinería y se espera que beneficie a la futura economía circular. Sin embargo, la valorización de la lignina se ve obstaculizada por una serie de limitaciones, como la naturaleza polimérica heterogénea, la recalcitrancia intrínseca, el fuerte olor, el color oscuro y la producción de una compleja mezcla de compuestos aromáticos durante la degradación. En la actualidad, fuera de usar la lignina para la producción de electricidad y en el proceso de fabricación de la pulpa; una valorización exitosa de la lignina ha sido bastante desafiante (Collins et al., 2019).

Se han realizado varios estudios para convertir la lignina en productos de mayor valor añadido (Yoo & Ragauskas, 2021). En la literatura, la mayoría de la información sobre la valorización de la lignina y obtención de productos de valor añadido describe principalmente procesos independientes centrados en la reacción y la separación/purificación de los productos en diferentes condiciones de degradación de las fracciones de lignina extraídas mediante diversos métodos convencionales de conversión. Estos procesos se enmarcan en: termoquímicos (pirólisis, gasificación y asistencia por microondas), químicos (catalizados por ácidos, catalizados por bases, asistidos por líquidos iónicos, asistidos por fluidos sub o supercríticos, oxidativos y de hidroprocesamiento) y biológicos (utilizando bacterias, hongos o enzimas (Li et al., 2015). Otros estudios han revelado importantes aplicaciones como los hidrogeles a base de lignina, los surfactantes, los materiales de impresión tridimensional, los electrodos y la producción de productos químicos finos. Aunque los estudios de conversión de lignina proporcionan una excelente valorización (Poveda et al., 2021), no se deja de lado las limitaciones que en muchos procesos afectan su valorización industrial, por lo que, hoy día se trabaja para dar posibles soluciones y perspectivas de futuro, a la luz de su abundancia y de sus potenciales aplicaciones.

## 2.3 Subproductos del cacao como fuente de material lignocelulósico.

### 2.3.1 El cacao

El cacao (*Theobroma cacao*, L.) es una especie del género *Theobroma*, de la familia de las malváceas, la cual cuenta con 20 - 22 especies (Avendaño et al., 2011); la cual es nativa de América central y Sudamérica, específicamente de la cuenca amazónica (Oetterer et al., 2006; Gonzáles et al., 2013). Botánicamente, el fruto del cacao es considerado una baya, este alcanza una longitud de 15 a 25 cm y un diámetro de 8 a 13 cm (Kim et al., 2011), son de sabor amargo, color púrpura o blancuzco y se parecen a las almendras (SAGARPA, 2017) (Figura 5).

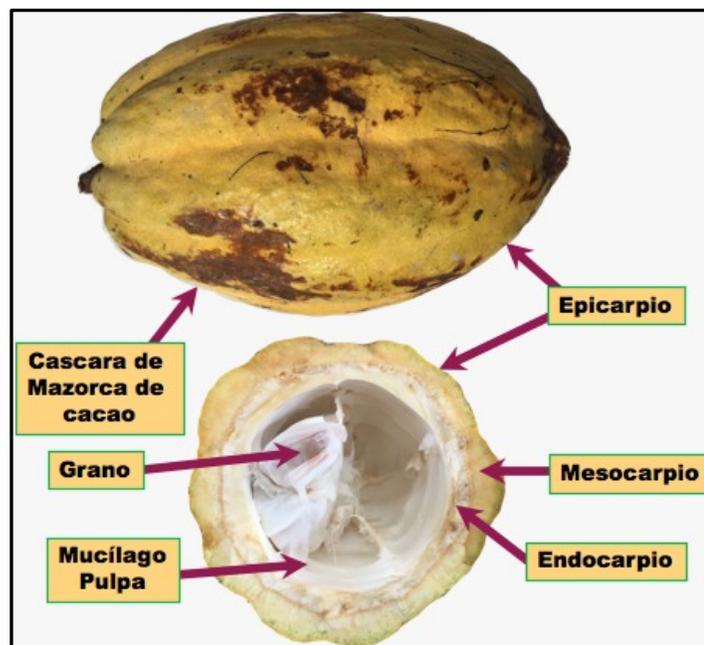


Figura 6. Las estructuras del fruto del cacao

Generalmente se presentan dos periodos de cosecha al año, la cosecha mayor, cuando se recolecta la mayor parte de la producción y la llamada cosecha menor. Estos periodos de cosecha varían en cada país, siendo para México los

siguientes: cosecha menor Octubre a Febrero y la cosecha mayor de Marzo a Agosto (Avendaño et al., 2011).

Durante la propagación natural del cacao, algunos híbridos se expandieron en dos direcciones, resultando en dos principales grupos de cacao: criollo y forastero. El criollo por América central y el sur de México mientras que el forastero se propagó a través del sur del río Amazonas y Guyana (Ceplac, 2015). Por otro lado, los cacaos trinitarios están constituidos por poblaciones híbridas, producto de cruzamientos espontáneos entre criollos y forasteros (Figura 2)



Figura 7. Variedades de cacao, a) Criollo, b) Forastero c) Trinitario

La producción de grano cacao en 2019-2020 fue de 4,735 millones de toneladas en todo el mundo, siendo el continente africano el que aporta mayor cantidad 74.9 %, seguido de América con 19.1 % y Asia y Oceanía con 6% (ICCO, 2022) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Producción mundial de grano de cacao (ICCO, 2022)

Región / País	Producción (miles de toneladas)	Porcentaje (%)
África	3549	74.9
Camerún	280	
Costa de Marfil	2105	
Ghana	771	
Nigeria	250	
Otros	143	
América	903	19.1
Brasil	201	
Ecuador	342	
Asia y Oceanía	283	6.0
Indonesia	200	
Papua Nueva Guinea	41	
Otros	42	
Total	4735	100

De acuerdo con el SIAP (2022) en México en 2020 la producción de cacao fue de 30,054.98 toneladas siendo el principal productor el estado de Tabasco con una producción de 19,194.51 toneladas, Chiapas con una producción de 10,565.68 toneladas y por último el estado de Guerrero con 294.79 toneladas (Figura 7), lo que representa una participación en la producción del 63.86%, 35.15% y 0.98% respectivamente a nivel nacional, lo que representa una participación a nivel global del 0.60%.

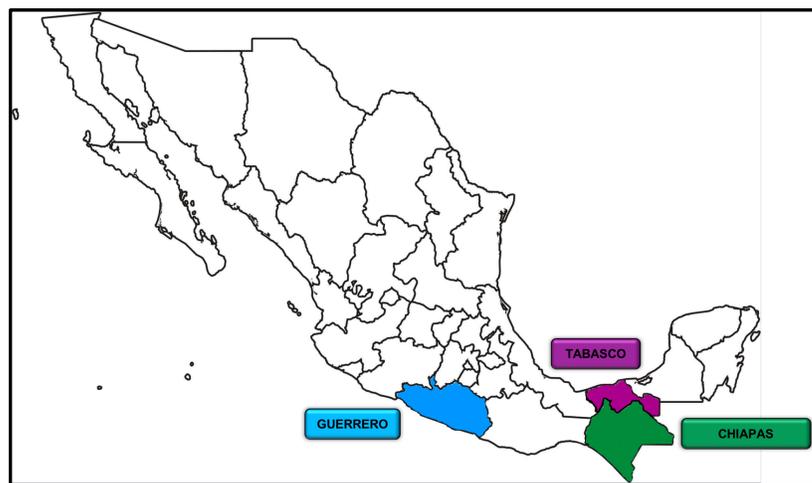


Figura 8. Estados productores de cacao en México

### 2.3.2 Procesamiento del cacao

La cadena de procesamiento del cacao ha permanecido sin cambio en los últimos 150 años (Vásquez et al., 2019). La transformación de los granos de cacao en productos finales como chocolate, pasta de cacao, manteca de cacao, polvo y licor de cacao, requiere de una serie de pasos que se pueden agrupar en dos fases principales: pre procesamiento y procesamiento (Okiyama et al., 2017). La primera fase toma parte directamente en el campo y consiste en la cosecha de las mazorcas, recuperación de los granos, fermentación y secado. Una vez que la mazorca es abierta, la cáscara y la mayor parte de la pulpa son descartadas. Solo los granos de cacao pasan a la fase de procesamiento, la cual toma lugar en fábricas que principalmente se ubican fuera de los países productores de

cacao, incluyendo la Unión Europea (40% del total de cacao procesado) y Estados Unidos, pero también en Brasil e Indonesia (Quelal et al., 2019). En esta fase, los granos de cacao se someten a una limpieza con el objetivo de eliminar suciedad e impurezas antes de tostarlos. El procesamiento de los granos termina con pasos de molienda que dan lugar a la masa de cacao, que puede seguir procesándose para obtener manteca de cacao y cacao en polvo (Mariatti et al., 2021) (Figura 8). La masa residual del procesamiento del cacao incluida la CMC, cáscara del grano, pulpa y otros desechos representan el 67-76% del peso seco. Cada tonelada de granos de cacao se generan aproximadamente 10 toneladas de CMC húmedo, con ~80% de humedad (Campos et al., 2018).

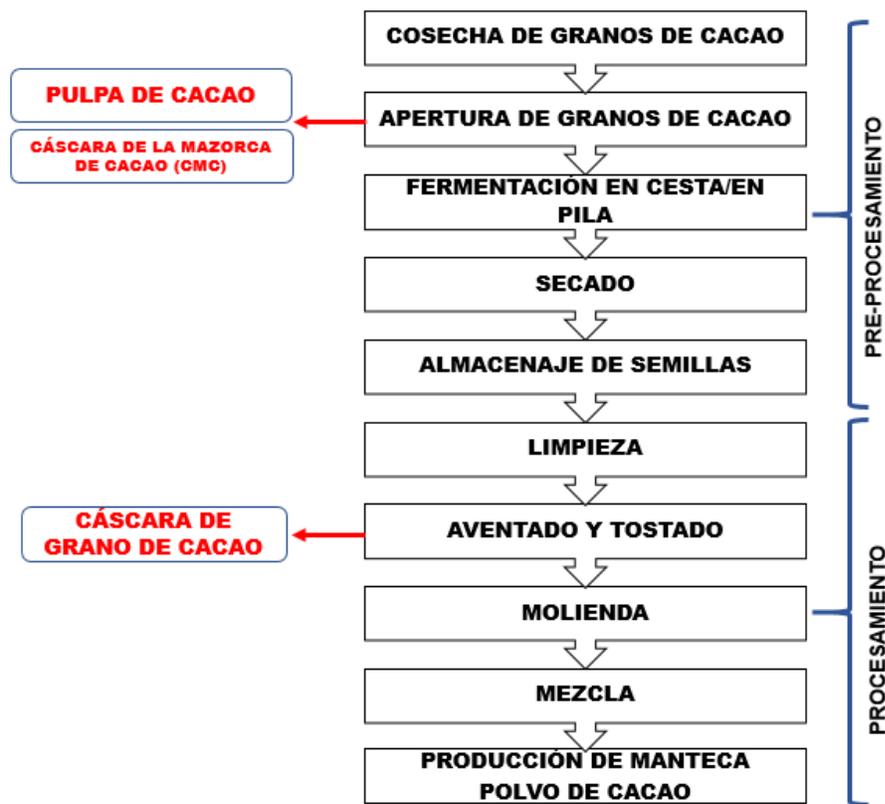


Figura 9. Diagrama de flujo de transformación del cacao en producto final y generación de subproductos

### **2.3.3 Cáscara de la mazorca del cacao (CMC)**

La CMC es la parte externa del fruto (epicarpio), el cual tiene un aspecto ovalado, rugoso y relativamente grueso. La CMC se presenta en diferentes colores según la variedad, rojo para la variedad criollo, verde para forastero y variable para trinitario y su rugosidad lo protege contra los elementos, las plagas y los daños que puedan causar los impactos. Tras la extracción de los granos, la CMC representa entre el 70-80% (Outtara et al., 2021); 67-76% (Pérez et al., 2015; Campos et al., 2018; Adjin et al., 2018) del peso seco del fruto entero. En estudios recientes, Valladares-Diestra et al (2022) han reportado los análisis de la composición química de la CMC para los principales constituyentes lignocelulósicos, incluyendo la celulosa (19.7-26.1%), hemicelulosa (8.7-12.8%), lignina (28%), pectina (6.0-12.6%) y cenizas (6.4-8.4% p/p). Otros estudios informan acerca del contenido de minerales particularmente en K (2.8-3.8% p/p) seguido de Ca, Mg y P (Vásquez et al., 2019). También se ha demostrado como una fuente compuestos fenólicos (Mashuni et al., 2020). Además, se ha utilizado la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) para identificar otros componentes como: terpenoides (crioplenol), flavonoides derivados del kaempferol, ramnetina), ácidos fenólicos y carboxílicos (ácido protocatéquico, ácido salicílico, ácido cítrico y ácido tartárico) y algunos aminoácidos libres (glutamina, asparaginas, serina y lisina) (Rachmawaty et al., 2018). El Cuadro 5, resume algunos componentes químicos de la CMC.

### **2.3.4 Valorización de la CMC**

El interés y el uso de los residuos de cacao han aumentado constantemente. Estos subproductos, incluido la CMC, se han explorado comercial e industrialmente mediante la investigación y el desarrollo de patentes, aprovechando su composición (Valladares-Diestra et al., 2022). La oportunidad de valorizar la CMC hacia aplicaciones de valor añadido es enorme, dada su gran abundancia y el hecho de que el cacao se cultiva principalmente en países en

vías de desarrollo, en los cuales se ha incentivado el aumento constante en la producción cacaotera (Lu et al., 2018). Dependiendo del uso y aplicación de las CMC, se han clasificado en aplicaciones de bajo valor a otras de mayor interés industrial.

Cuadro 5. Composición química de la cáscara de la mazorca de cacao (g.100 g<sup>-1</sup> materia seca) adaptado de Vásquez et al. (2019)

<b>Compuesto</b>	<b>Contenido en CPH (% P/P en materia seca)</b>
Carbohidratos	29.04-32.3
Celulosa	24.24–35.0
Hemicelulosa	8.72–11.0
Lignina	14.6–26.38
Proteínas totales	4.21-10.74
Lípidos	1.5–2.24
Pectinas	6.1–9.2
Cenizas	6.7–10.02
Fibra dietética total	36.6–56.10
Teobromina	0.34
Fenoles totales	4.6-6.9 (g Equivalente de ácido Gálico/100 g)
Taninos	5.2
Minerales	(mg 100 g <sup>-1</sup> Materia seca)
	3230.85
Ca	254.0
Cu	6.18
Fe	5.8
K	2768.0
Mg	110.9
Mn	35.72
Na	10.5
Se	0.01
Zn	39.74

### **2.3.4.1 Aplicaciones de bajo valor de la CMC**

#### **2.3.4.1.1 Fertilizante y materia orgánica del suelo**

Tras la extracción de los granos de cacao, la CMC suele quemarse (Vásquez et al., 2019) o desecharse en la explotación y puede funcionar como abono orgánico, una práctica que añade materia orgánica al suelo y permite el retorno de los nutrientes al suelo y su reciclaje a formas disponibles para las plantas tras su descomposición (Aboyeji et al., 2016). Este método es comúnmente aplicado en países africanos en vía de desarrollo como Nigeria y Ghana, dos importantes productores de cacao (Lu et al., 2018). En condiciones climáticas favorables, la CMC puede convertirse en un reservorio de hongos patógenos indeseables, como *Marasmius perniciosus*, *Phytophthora palmivora* y *P. megakarya*. La *Phytophthora spp*, es responsable de la podredumbre de la mazorca, o mazorca negra, una enfermedad que afecta a genotipos de plantas de cacao susceptibles, y que causa pequeñas lesiones oscuras en la mazorca que se extienden rápidamente por la superficie del fruto y los tejidos internos (es decir, los granos y la pulpa). La podredumbre negra de la mazorca causa una pérdida de rendimiento anual del 20% al 30% en todo el mundo, mientras que las explotaciones individuales pueden sufrir una pérdida de rendimiento anual del 30% al 90% (Acebo et al., 2011).

#### **2.3.4.1.2 Fabricación de jabón**

La CMC también podría ser un material de partida para la fabricación de jabón en los países de África occidental, mediante un proceso que incluye etapas de cenización, lixiviación, filtración y concentración, saponificación, enfriamiento y corte. Después de quemar la CMC hasta convertirla en una ceniza que contiene  $K_2O$ , estas se lixivian con agua y generan la correspondiente potasa de CMC (hidróxido de potasio, KOH), cada tonelada de CMC fresca generaría unos 6 kg de potasa (Gyedu et al., 2015). La potasa podría filtrarse más, concentrarse y utilizarse en la saponificación con aceite para producir jabones.

#### **2.3.4.1.3 Alimentación animal**

Otra aplicación común de la CMC es la alimentación del ganado como alternativa a la importante acumulación de residuos en las plantaciones de cacao y sus mínimos requisitos de procesamiento principalmente en puercos, conejos, aves de corral y peces (Lu et al., 2018). Las proteínas, la energía y algunos micronutrientes de la CMC hacen que sea una adición ideal a la alimentación animal (Nortey et al., 2015). Sin embargo, debe utilizarse en bajas concentraciones debido a la presencia de teobromina, que se considera un compuesto perjudicial en la alimentación animal (Alexander et al., 2008). Teniendo en cuenta este hecho, la CMC podría ser una valiosa fuente de fibra dietética que, combinada con otras propiedades, puede transformar este subproducto en una atractiva fuente de nutrición complementaria para los animales.

#### **2.3.4.1.4 Carbón activado**

El carbón activado también puede producirse a partir de la CMC mediante activación física o química. La carbonización y la activación implican un tratamiento físico/térmico. En un estudio reciente, el CMC se secó a 500 °C con un flujo de N<sub>2</sub> (carbonización), seguido de la aplicación de un flujo de CO<sub>2</sub> a 650-850 °C durante 30 minutos (activación) (Tsai & Huang, 2018). El estudio mencionado indica que la CMC podría utilizarse como fuente alternativa para producción de carbón activado, proporcionando una alta superficie y capacidad de adsorción si se le da un tratamiento adecuado. El bajo precio de la CMC, comparado con los precursores tradicionales como la antracita, el carbón o la turba, podría mejorar su potencial económico con una reducción de los costes globales de producción.

## **2.3.4.2 Aplicaciones actuales y potenciales de alto valor de la CMC y sus fracciones**

### **2.3.4.2.1 Fabricación de papel**

En Malasia se han realizado estudios sobre la sustitución de la fibra de madera por fibra vegetal, incluida la CMC, para la fabricación de papel (Daud et al., 2013). Un contenido alto de celulosa es considerado ventajoso en la industria de la pulpa y papel porque produce un mayor contenido de pulpa después del proceso de cocción. La lignina es uno de los componentes estructurales de las plantas que une las fibras de celulosa. Antes de la fabricación de papel, la lignina debe ser eliminada de la pulpa porque afecta al rendimiento y disminuye la calidad del papel (Abdul et al., 2006). La composición química y el estudio morfológico indicaron que la CMC produciría una pulpa para las industrias papeleras comparable a la de los recursos madereros (Daud et al., 2013).

### **2.3.4.2.2 Biocombustibles**

La CMC está principalmente compuesta por cenizas (9.1%), celulosa (35%), hemicelulosa (11%), lignina (14.6%) (Campos et al., 2018). Por otro lado, polisacáridos, como la celulosa y hemicelulosa, que son ricos en azúcares fermentables (C5 y C6), muestran un gran potencial para la producción de biocombustibles de segunda generación y otras biomoléculas (Valladares et al., 2021), además de moléculas plataforma (Igbinador & Onilude, 2013; Mansur et al., 2014).

El proceso fundamental de producción de biocombustibles a partir de biomasa lignocelulósica mediante fermentación implica pasos de pretratamiento para aumentar la susceptibilidad de la celulosa/hemicelulosa a la hidrólisis enzimática, lo que conduce a la producción de monosacáridos asimilables. La hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica da lugar a un licor que contiene mezclas

de azúcares hexosas y pentosas, fermentadas por cepas de levadura. En otros procesos las CMC se han carbonizado a 400 °C por 2 horas, obteniéndose un alto valor calorífico (17 MJ Kg<sup>-1</sup>) con alto contenido de cenizas (Syamsiro et al., 2012), esto demuestra el potencial de las cáscaras como fuente de energía renovable.

En otros estudios, Olatundun et al. (2020), han mostrado la capacidad catalítica de CMC en mezclas con otros componentes para la síntesis de Biodiesel a través de la transesterificación de aceites, de varios orígenes vegetales. Acebo et al. (2018) utilizaron la CMC para producir metano. Su trabajo consistió en evaluar el potencial bioenergético de la CMC mediante digestión anaeróbica donde se demostró que hasta el 50% de la materia orgánica de los residuos de cacao se transformó en biogás con un contenido de metano del 60%. Además, Adjin-Tetteh et al. (2018) estudio la conversión térmica de CMC para la producción de bioaceite a través del proceso de pirólisis rápida, demostrando que la CMC es una excelente materia prima para la pirólisis. Adicionalmente, Sandesh et al., (2020) ha estudiado sistemas de fermentación de CMC en acetona-butanol-etanol, utilizando *Clostridium Acetobutlicum* MTCC11274ABE como pretratamiento una hidrolisis acida. Recientemente, se ha probado un motor modificado de encendido por compresión, generalmente utilizado en la generación de energía a pequeña escala, para trabajar con diésel y gas producto de cascara de mazorca de cacao (Chockalingam et al., 2022)

#### **2.3.4.2.3 Pectinas**

La CMC es considerada una excelente fuente de fibra dietética soluble, que incluye la pectina, β-glucano, oligosacáridos y algo de hemicelulosa (Yapo et al., 2013). Se estima que la pectina es un ingrediente importante en los productos alimentarios por sus propiedades gelificantes, formadoras de película y espesantes, que pueden mejorar la textura y la estabilidad de los productos alimenticios. La pectina de la CMC puede extraerse por diferentes métodos químicos, físicos o fisicoquímicos. Los tratamientos químicos que emplean ácidos inorgánicos como catalizadores son los métodos más comunes para la extracción de pectina (Chen et al., 2021). Para reducir derivados tóxicos para la salud y el

medio ambiente, recientemente se han usado ácidos orgánicos como el ácido acético, el ácido ascórbico o el ácido cítrico como alternativas ecológicas al proceso de obtención de pectina (Van Hung et al., 2021). Actualmente se ha implementado el uso de extracción de pectina asistida por microondas con excelentes rendimientos y una alta contribución a los procesos verdes (Sarah et al., 2022).

#### **2.3.4.2.4 Antioxidantes alimentarios: Compuestos fenólicos**

Los métodos habituales de extracción de compuestos fenólicos de la CMC incluyen el uso de disolventes orgánicos. La eficacia de la extracción puede variar en función de las propiedades químicas de los disolventes orgánicos (Lu et al., 2018). Se ha determinado el contenido fenólico total del extracto etanólico al 70% y extracto acetónico: agua (7:3) obteniéndose respectivamente los valores: 94.92 GAE/g, 49.92 GAE/g. Mientras que la actividad antioxidante de los mismos extractos respectivamente tuvo los siguientes valores: 88.16%, 44.11% (Rachmawaty et al., 2019). En otros trabajos, Valadez et al., (2018) utilizaron la extracción con fluidos supercríticos, considerada una tecnología verde, para extraer compuestos fenólicos de la CMC. Se han identificado varios compuestos fenólicos mediante LC-MS/MS, en la CMC fresca encontrándose catequina (36%), quercetina (21%), epicatequina (21%) y ácidos gálicos (11.3%), cumárico (6.5%) y protocatéquico (4.5% del total de compuestos fenólicos). El contenido de fenoles totales, flavonoides y flavonoles de la CMC fresca fue de 3.24 mg GAE/g, 0.97 mg y 0.34 mg de epicatequina equivalente (EE)/g, respectivamente (Valadez et al., 2017). También se ha estudiado el efecto de las microondas para la extracción de compuestos fenólicos, como un método rápido y eficiente en un contexto verde (Mashuni et al., 2020).

#### **2.3.4.2.5 Compuestos volátiles**

Tiburcio (2017) logró identificar 50 compuestos volátiles en la CMC mediante SPME (5/95% Carboxeno/Polidimetilsiloxano, 75 µm) seguido de desorción y

separación en columna GC 95% PDMS, 5% fenilo (30m×0,25 mm, 0,25 µm de espesor de película). Estos compuestos consistían en 16 alcoholes, 11 hidrocarburos, 8 aldehídos, 7 cetonas, 5 ésteres, 2 aminas y ácido isovalérico. Sin embargo, la fermentación en estado sólido de CMC con *Rhizopus stolonifera* NRRL 28169 (incubada en un agitador rotatorio a 100 rpm, 30 °C, pH 5,5, 7 días) redujo el número (de 50 a 33) de compuestos volátiles identificados.

## 2.4 Literatura citada

- Abdul, H., Siti, M., & Mohd, A. (2006). Chemical Composition, anatomy,, Lignin, Distribution, and Cell Wall Structure of Malaysian Plant Waste Fibers. *BioReourses*, 220-232.
- Aboyeji, C., Olofintoye, T., Olaleye, O., Olugbemi, O., & Adetula, O. (2016). Influence of Cocoa Pod Husk Powder on the Performance of Black Bennisseed under Basal Application Phosphorus in the Souther Guinea Savannah of Nigeria. *Advances in Environmental Biology*, 78-83.
- Acebo Gyedu Acosta, N., De Vrieze, J., Sandoval, V., Sinche, D., Wierinck, I., & Rabaey, K. (2018). Cocoa residues as viable biomass fro renewable energy production through anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 568-572. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.100>
- Acebo, Y., Hernández, A., Heydrich, M., El Jaziri, M., & Hernández, A. (2011). Managment of black pod rot in cacao (*Theobroma cacao L.*) a review. *Fruits*, 41-48. doi:<https://doi.org/10.1051/fruits/2011065>
- Adams, G. (1965). Lignin determination . En R. Whistler, *Methods in Carbohydrate Jchemistry* (págs. 185-187). New York: Academic Press.
- Adjin, M., Asiedu, N., Dodoo, D., Karam, A., & Amaniampong, P. (2018). thermochemical conversion and characterization of cocoa pod husks a potential agricultural waste from Ghana. *Industrial Crops and Products*, 304- 312. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.060>
- Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B. (2011). Biomass Pretreatment: Fundamentals Toward Application. *Biotechnology Advances*, 29(6), 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005>
- Ahmad , E., & Pant , K. K. (2018). Lignin conversion: a key to the concept of lignocellulosic biomass-based integrated biorefinery. In T. Bhaskar, A. Pandey, S. V. Mohan, D.-J. Lee, & S. K. Khanal (Eds.), *Waste biorefinery potential and perspectives* (1st ed., pp. 409–444). essay, Elsevier.

- Alexander, J., Benford, D., Cockburn, A., Cravedi, J., Dogliotti, E., Di Domenico, A., . . . Verger, P. (2008). Theobromine as undesirable substances in animal feed Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal*, 1-66.  
doi:<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.725>
- Avendaño, C., Villarreal, J., Campos, E., Gallardo, R., Mendoza, A., Aguirre, J., . . . Espinosa, S. (2011). *Diagnóstico del cacao en México*. México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Ayyachamy, M., Cliffe, F., Coyne, J., Collier, J., & Tuohy, M. (2013). Lignin: untapped biopolymers in biomass conversion technologies. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 255-269. doi:<https://doi.org/10.1007/s13399-013-0084-4>
- Baidoo, M. F., Yaw Asiedu, N., Darkwah, L., Arhin-Dodoo, D., Zhao, J., Jerome, F., & Nana Amaniampong, P. (2022). Conventional and unconventional transformation of cocoa pod husks into value-added products. *Biomass, Biorefineries and Bioeconomy*.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.102606>
- Behling, R., Valange, S., & Chatel, G. (2016). Heterogeneous catalytic oxidation for lignin valorization into valuable chemicals: What results? what limitations? what trends? *Green Chemistry*, 18(7), 1839–1854.  
<https://doi.org/10.1039/c5gc03061g>
- Ben, H., Mu, W., Deng, Y., & Ragauskas, A. (2013). Production of renewable gasoline from aqueous phase hydrogenation of lignin pyrolysis oil. *Fuel*, 1148-1153. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.08.039>
- Bergna, D., Varila, T., Romar, H., & Lassi, U. (2022). Activated carbon from hydrolysis lignin: Effect of activation method on carbon properties. *Biomass and Bioenergy*, 159, 106387.  
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106387>
- Bertella, S., & Luterbacher, J. (2020). Lignin Functionalization for the Production of Novel Materials. *Trends in Chemistry*, 440-453.
- Borges Gomes, F. J., de Souza, R. E., Brito, E. O., & Costa Lelis, R. C. (2020). A review on lignin sources and uses. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, 100–105.  
<https://doi.org/10.15406/jabb.2020.07.00222>
- Borges, E., Zabkova, M., Araffljo, J., Cateto, C., Barreiro, M., & Belgacem, M. R. (2009). An integrated process to produce vanillin and lignin-based polyurethanes from kraft lignin. *Chemical Engineering Research and Design*, 1276-1292. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2009.05.008>

- Boro, M., Verma, A. K., Chettri, D., Yata, V. K., & Verma, A. K. (2022). Strategies involved in biofuel production from agro-based lignocellulose biomass. *Environmental Technology & Innovation*, 28, 102679. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102679>
- Budzianowski, W. (2016). High-value low-volume bioproducts coupled to bioenergies with potential to enhance business development of sustainable biorefineries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 793-804. doi:10.1016/j.rser.2016.11.260
- Bunzel, M., Schüßler, A., & Tchetsseubu, G. (2011). Chemical Characterization of Klason Lignin Preparations From Plant-Based Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 12506-12513. doi:dx.doi.org/10.1021/jf2031378
- Cadvar, A., Kalaycioglu, H., Hizioglu, S., & Mater, J. (2008). Some of the properties of oriented strandboard manufactured using kraft lignin phenolic resin. *Journal of Materials Processing technology*, 559-563. doi:https://doi.org/10.1016/j.jmatprotec.2007.10.039
- Campos, R., Nieto, K., & Oomah, B. (2018). Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 172-184. doi:https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.022
- Carvajal, J. C., Gómez, Á., & Cardona, C. A. (2016). Comparison of lignin extraction processes: Economic and Environmental Assessment. *Bioresource Technology*, 214, 468–476. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.103>
- Ceplac. (20 de Febrero de 2015). *Cadeia Produtivs do Cacau - Curiosidades*. Obtenido de Cacau-Curiosidades: [www.ceplac.gov.br/radar/radar\\_cacau.htm](http://www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm)
- Chakravarty, I., Gahane, D., & Mandavgane, S. (2022). Recent advances in lignin valorization. *Advanced Biofuel Technologies*, 365–388. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-88427-3.00018-0>
- Chávez-Sifontes, M., & Domine, M. E. (2013). structure and applications: depolymerization methods for obtaining aromatic derivatives of industrial interest. *Avances En Ciencias e Ingeniería.*, 4, 15–46.
- Chen, C. (1992). Nitrobenzene and cupric oxide oxidations. En S. Lin, & C. Dence, *Methods in Lignin Chemistry* (pág. 301). Berlin: Springer-Verlag.
- Chen, H. (2015). Lignocellulose biorefinery feedstock engineering. In *Lignocellulose Biorefinery Engineering* (1st ed., pp. 37–86). essay, Woodhead Publishing.

- Chen, H., Liu, J., Chang, X., Chen, D., Xue, Y., Liu, P., & Lin, H. S. (2017). A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Processing Technology*, 196-206.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.12.007>
- Chen, J., Cheng, H., Zhang, H., Linhardt, R., Zhang, F., Chen, S., & Ye, X. (2021). Extraction temperature is a decisive factor for the properties of pectin. *Food Hydrocolloids*.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106160>
- Chen, Z., Ragauskas, A., & Wan, C. (2020). Lignin extraction and upgrading using deep eutectic solvents. *Industrial Crops and Products*, 147, 112241
- Chockalingam, M. P., Gunasekaran, A. P., & Santhappan, J. S. (2022). Multi-response optimization on the gasification of cocoa pod (*Theobroma cacao*) husk and its performance in a multi-fuel engine. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02553-7>
- Collins, M. N., Nechifor, M., Tanasă, F., Zănoagă, M., McLoughlin, A., Strózyk, M. A., Culebras, M., & Teacă, C.-A. (2019). Valorization of lignin in polymer and composite systems for Advanced Engineering Applications – A Review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 828–849. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.069>
- Daud, Z., Mohd, A., Mohd, A., Awang, H., & Mohd, M. (2013). Chemical Composition and Morphological of Cocoa Pod Husks and Cassava Peels for Pulp and Paper Production. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 406-411.
- de la Torre, M., Dolores, M., Cabeza, E., & Tijero, A. (2013). Organosolvo lignin for biofuel. *Industrial Crops and Products*, 58-63.  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.002>
- de Souza, L., Valladares, K., Amaro, G., Murawski, F., Vásquez, Z., Zwiercheczewski, P., . . . Soccol, R. (2022). Added-value biomolecules' production from cocoa pod husks: A review. *Bioresource Technology*.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126252>
- Dence, C., & Lin, S. (1992). Introduction. En S. Lin, & C. Dence, *Methods in Lignin Chemistry* (págs. 3-19). Berlin: Springer-Verlag. doi:10.1007/978-3-642-74065-7
- Dewi, S. R., Stevens, L. A., Pearson, A. E., Ferrari, R., Irvine, D. J., & Binner, E. R. (2022). Investigating the role of solvent type and microwave selective heating on the extraction of phenolic compounds from cacao (*theobroma cacao* L.) pod husk. *Food and Bioprocess Processing*, 134, 210–222.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2022.05.011>

- Donia, E., Mineo, A., & Sgroi, F. (2018). A methodological approach for assessing business investments in renewable resources from a circular economy perspective. *Land Use Policy*, 823-827. doi:<https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2018.03.017>
- Dou, J., Kim, H., Li, Y., Padmakshan, D., yue, F., Ralph, J., & Vuorinen, T. (2018). Structural Characterization of Lignins from Willow Bark and Wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02014>
- El Hage, R., Brosse, N., Chrusciel, L., Sanchez, C., Sannigrahi, P., & Ragauskas, A. (2009). Characterization of milled wood lignin and ethanol organosolv lignin from miscanthus. *Polymer Degradation and Stability*, 1632-1638. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2009.07.007
- Faleva, A., Kozhevnikov, A., Pokryshkin, S., Belesov, A., & Pikovskoi, I. (2020). Structural characterization of the lignin from Saxifraga (Saxifraga oppositifoliaL.) stems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 656-665. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.258>
- Gbenebor, O. P., & Adeosun, S. O. (2019). Lignin conversion to carbon fibre. *Sustainable Lignin for Carbon Fibers: Principles, Techniques, and Applications*, 51–64. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-18792-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-18792-7_2)
- Gellerstedt, G., & Henriksson, G. (2008). Lignins: Major Sources, Structure and Properties. En M. Naceur, & A. Gandini, *Monomers, Polymers nad Composites from Renewable Resources* (págs. 201-224). Elsevier. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045316-3.00009-0>
- Gonzáles, A., Vital, A., Lima, J., & Rodrigues, M. (2013). Desenvolvimento sustentável para o resgate da cultura do cacau baseado no aproveitamento de resíduos. *Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente*, 41-52. doi:<https://doi.org/10.17564/2316-3798.2013v1n2p41-52>
- Gordobil, O., Herrera, R., Poohphajai, F., Sandak, J., & Sandak, A. (2021). Impact of drying process on kraft lignin: lignin-water interaction mechanism study by 2D NIR correlation spectroscopy. *Journal of Materials Research and Technology*, 159-169. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.02.080>
- Gyedu, E., Yabani, D., Sefa, J., & Owusu, D. (2015). Natural Skin-care Products: The Case of Soap Made from Cocoa Pod Husk Potash. *Advances in research*, 365-370. doi:10.9734/AIR/2015/17029
- Igbinador, R., & Onilude, A. (2013). Bioprocess systems applied for the production of bioethanol from lignocellulosic biomass of cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.) and other agricultural residues: A review. *African*

*Journal of Biotechnology*, 5375-5388.  
doi:<https://doi.org/10.5897/AJB2013.12890>

- International Cocoa Organization . (28 de Febrero de 2022). ICCO. Obtenido de ICCO Statistics: [https://www.icco.org/wp-content/uploads/Production\\_QBCS-XLVIII-No.-1.pdf](https://www.icco.org/wp-content/uploads/Production_QBCS-XLVIII-No.-1.pdf)
- Isikgor, F. H., & Becer, C. R. (2015). Lignocellulosic biomass: A sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*, 6(25), 4497–4559. <https://doi.org/10.1039/c5py00263j>
- Kim, J., Lee, K., & Lee, H. (2011). Cocoa (*Theobroma cacao*) Seeds and Phytochemicals in Human Health. En V. Preedy, V. Patel, & R. Watson, *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention* (págs. 351-360). Elsevier Inc. doi:<https://doi.org/10.1016/C2009-0-01960-6>
- Kothari, R., Singh, A., & Arora, N. K. (Eds.). (2022). *Biomass, Bioenergy & Bioeconomy*. SPRINGER VERLAG, SINGAPOR.
- Krüger, A., Schäfers, C., Schröder, C., & Antranikian, G. (2018). Towards a sustainable biobased industry—Highlighting the impact of extremophiles. *New Biotechnology*, 144-153. doi:[10.1016/j.nbt.2017.05.002](https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.05.002)
- Kumar, B., Bhardwaj, N., Agrawal, K., Chaturvedi, V., & Verma, P. (2020). Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: an emerging biorefinery concept. *Fuel Processing Technology*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.106244>
- Lachenal, D. (2016). Kraft pulping. *Lignocellulosic Fibers and Wood Handbook*, 207–223. <https://doi.org/10.1002/9781118773727.ch7>
- Lai, Y., & Sarkanen, K. (1971). Isolation and structural studies. En K. Sarkanen, & C. Ludwig, *Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions* (págs. 165-203). New York: Wiley Interscience.
- Lateef, A., Azeez, M., Asafa, T., Yekeen, T., Akinboro, A., Oladipo, L., . . . Beukes, L. (2016). Cocoa pod husk extract-mediated biosynthesis of silver nanoparticles: its antimicrobial, antioxidant and larvicidal activities. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 159-169. doi:<https://doi.org/10.1007/s40097-016-0191-4>
- Lehto, J., & Alén, R. (2014). Alkaline pre-treatment of softwood chips prior to delignification. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 35(2), 146–155. <https://doi.org/10.1080/02773813.2014.902964>
- Li, C., Zhao, X., Wang, A., Huber, G., & Zhang, T. (2015). Catalytic Transformation of Lignin for the Production of Chemicals and Fuels. *Chemical Reviews*. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00155>

- Liao, J., Abs Latif, N., Trache, D., Brosse, N., & Hussin, M. (2020). Current advancement on the isolation, characterization and application of lignin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 985-1024. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.168>
- Liu, F., Chen, Y., & Gao, J. (2017). Preparation and characterization of biobased graphene from Kraft Lignin. *BioResources*, 12(3). <https://doi.org/10.15376/biores.12.3.6545-6557>
- Liu, W.-J., & Yu, H.-Q. (2021). Thermochemical conversion of lignocellulosic biomass into mass-producible fuels: Emerging technology progress and environmental sustainability evaluation. *ACS Environmental Au*, 2(2), 98–114. <https://doi.org/10.1021/acsenvironau.1c00025>
- Lobato-Peralta, D. R., Duque-Brito, E., Villafán-Vidales, H. I., Longoria, A., Sebastian, P. J., Cuentas-Gallegos, A. K., Arancibia-Bulnes, C. A., & Okoye, P. U. (2021). A review on trends in lignin extraction and valorization of lignocellulosic biomass for energy applications. *Journal of Cleaner Production*, 293, 126123. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126123>
- Løhre, C., Kleinert, M., & Barth, T. (2017). Organosolv Extraction of Softwood Combined with Lignin-to-Liquid-Solvolysis as a Semi-Continuous Percolation Reactor. *Biomass and Bioenergy*, 147-155. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.02.014>
- Lourenço, A., & Pereira, H. (2017). Compositional Variability of Lignin in Biomass. En M. Poletto, *Lignin: Trends and Applications* (págs. 65-98). IntechOpen. doi:10.5772/intechopen.71208
- Lu, F., Rodriguez, J., Van Damme, I., Westwood, N., Shaw, L., Robinson, J., . . . Charalampopoulos, D. (2018). Valorisation strategies for cocoa pod husk and its. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 80-88. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.07.007>
- Lu, Y., Lu, Y.-C., Hu, H.-Q., Xie, F.-J., Wei, X.-Y., & Fan, X. (2017). Structural characterization of lignin and its degradation products with spectroscopic methods. *Journal of Spectroscopy*, 2017, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2017/8951658>
- Madanayake, B., Gan, S., Eastwick, C., & Ng, H. (2017). Biomass as an energy source in coal co-firing and its feasibility enhancement via pre-treatment techniques. *Fuel Processing Technology*, 287-305. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2017.01.029>

- Mankar, A. R., Pandey, A., Modak, A., & Pant, K. K. (2021). Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. *Bioresource Technology*, 334, 125235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125235>
- Mansur, D., Tago, T., & Abimanyu, H. (2014). Conversion of cacao pod husks by pyrolysis and catalytic reaction to produce useful chemicals. *Biomass and Bioenergy*, 275-285. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.03.065>
- Mashuni, Hamid, F.H., Muzuni, Kadidae, L.O., Jahiding, M., Ahmad, L.O., Saputra, D., (2020). The determination of total phenolic content of cocoa pod husk based on microwave-assisted extraction method. AIP Conf. Proc. 2243 <https://doi.org/10.1063/5.0001364>.
- Mcdonough, T. (1993). The chemistry of organosolv delignification. *Tappi Journal*, 186-193
- Naegele, H., Pfitzer, J., Ziegler, L., Inone-Kauffmann, E. R., & Eisenreich, N. (2016). Applications of lignin materials and their composites (lignin applications in various industrial sectors, future trends of lignin and their composites). *Lignin in Polymer Composites*, 233–244. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-35565-0.00013-8>
- Nan, N., Hu, W., & Wang, J. (2022). Lignin-based porous biomaterials for medical and pharmaceutical applications. *Biomedicines*, 10(4), 747. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040747>
- Nortey, T., Ewusi, I., Kpogo, L., Oddoye, E., & Naazie, A. (2015). Cocoa pod husk with enzyme supplementation is a potential feed ingredient in broiler diets. *Livestock Research for Rural Development*.
- Obst, J., & Kirk, T. (1988). Isolation of lignin. En W. Wood, & T. Kellogg, *Methods in Enzymology, Biomass Part B* (págs. 3-12). New York: Academic Press.
- Oetterer, M., Regitano-D´Arce, & Spoto, M. (2006). *Fundamentos de ciencia e tecnologia de alimentos*. Sao Paulo: Editora Manole Ltda.
- Okiyama, D., Navarro, S., & Rodrigues, C. (2017). Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 103-112.
- Olatundun, E. A., Borokini, O. O., & Betiku, E. (2020). Cocoa pod husk-plantain peel blend as a novel green heterogeneous catalyst for renewable and Sustainable Honne Oil Biodiesel Synthesis: A case of biowastes-to-wealth. *Renewable Energy*, 166, 163–175. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.11.131>

- Outtara, L., Appiah, E., Soro, D., Yao, K., Adouby, K., Drogui, A., . . . Aina, P. (2021). Cocoa Pod Husks as Potential Sources of Renewable High-Value-Added Products: A Review of Current Valorizations and Future Prospects. *BioResources*, 1988-2020. doi:10.15376/biores.16.1.Ouattara
- Pereira, M., Henrique, P., Gomes, D., Botelho, J., Silveira, J. & Manureto, M. (2017). Extraction of Organosilv Lignin from Rice Husk under Reflux Conditions. *Biological and Chemical Research*, 87-98.
- Pérez, E., Méndez, A., León, M., Hernández, G., & Sivoli, L. (2015). Proximal Composition and the Nutritional and Functional Properties of Cocoa By-products (Pods and Husks) for their Use in the Food Industry. En E. Pérez, *Chocolate. Cocoa Byproducts Technology, Rheology, Styling and Nutrition* (págs. 219-234). New York: Nova Science Publishers.
- Pin, T., Nascimento, V., Costa, A., Pu, Y., Ragauskas, A., & Rabelo, S. (2020). Structural characterization of sugarcane lignins extracted from different protic ionic liquid pretreatments. *Renewable Energy*, 579-592. doi:https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.07.078
- Poveda, J., Solarte, J., & Cardona, C. (2021). The potential use of lignin as a platform product in biorefineries: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. doi:https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110688
- Quelal, M., Lerma, M., Pérez, E., Talens, P., & Barat, J. (2019). Roadmap of cocoa quality and authenticity control in the industry: A review of conventional and alternative methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1-31. doi:https://doi.org/10.1111/1541-4337.12522
- Rachmawaty, Mu'Nisa, A., Hasri Pagarra, H., Hartati Maulana, Z., (2018). Active compounds extraction of cocoa pod husk (*Thebroma cacao* L.) and potential as Fungicides. *J. Phys. Conf. Ser.* 1028 https://doi.org/10.1088/1742-6596/1028/1/ 012013.
- Rachmawaty, Mu'nisa, A., Hasri, Pagarra, H., & Hartati. (2019). Analysis of phenolic content and antioxidant activity of cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Physics: Conference Series*, 1317(1), 012087. https://doi.org/10.1088/1742-6596/1317/1/012087
- Ragauskas, A., Beckham, G., Bidy, M., Chandra, R., Chen, F., Davis, M., . . . Wyman, C. (2014). Lignin Valorization: Improving Lignin processing in the Biorefinery. *Science*. doi:10.1126/science.124684
- Rajesh Banu, J., Kavitha, S., Yukesh Kannah, R., Poornima Devi, T., Gunasekaran, M., Kim, S.-H., & Kumar, G. (2019). A review on

- biopolymer production via lignin valorization. *Bioresource Technology*, 290, 121790. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121790>
- Ralph, J., Lapierre, C., & Boerjan, W. (2019). Lignin structure and its engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.019>
- Rinaldi, R., Jastrzebski, R., Clough, M., Ralph, J., Kennema, M., Bruijninx, P., & Weckhuysen, B. (2016). Paving the Way for Lignin Valorisation: Recent Advances in Bioengineering, Biorefining and Catalysis. *Angewandte Chemie International Edition*, 8164-8215. doi:<https://doi.org/10.1002/anie.201510351>
- Saha, M., Bernstein, P., Borah, A., Malani, R., Arya, S. & Moholkar, V. (2019). Doxane-based extraction process for production of high quality lignin. *Bioresource Technology Reports*, 206-211. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.01.018>
- Sandesh, K., Shishir, R., & Vaman Rao, C. (2020). Optimization and comparison of induction heating and LPG assisted acid pretreatment of cocoa pod for ABE fermentation. *Fuel*, 262. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116499>
- Sarah, M., Hasibuan, I. M., Misran, E., & Maulina, S. (2022). Optimization of microwave-assisted pectin extraction from cocoa pod Husk. *Molecules*, 27(19), 6544. <https://doi.org/10.3390/molecules27196544>
- Sethupathy, S., Murillo Morales, G., Gao, L., Wang, H., Yang, B., Jiang, J., Sun, J., & Zhu, D. (2022). Lignin valorization: Status, challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, 347, 126696. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126696>
- Sharma, S., & Kumar, A. (2020). *Lignin: Biosynthesis and transformation for industrial applications*. Springer.
- SIAP. (2022). SIAP. Obtenido de Anuario Estadístico de la Producción Agrícola.
- Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2016). Biological Pretreatment of lignocellulosic biomass – an overview. *Bioresource Technology*, 199, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>
- Stark, N. M., Yelle, D. J., & Agarwal, U. P. (2016). Techniques for characterizing lignin. *Lignin in Polymer Composites*, 49–66. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-35565-0.00004-7>
- Statista, 2021. Global cocoa bean production in 2018/19 and 2020/21, by country [WWW Document]. Statista. URL <https://www.statista.com/statistics/263855/cocoa-bean-production-worldwide-by-region/> (accessed 10.25.22)

- Sun, R. (2020). Lignin Source and Structural Characterization. *ChemSusChem*, 4385-4393. doi:doi.org/10.1002/cssc.202001324
- Suota, M. J., Kohepka, D. M., Ganter Moura, M. G., Pirich, C. L., Matos, M., Magalhães, W. L., & Ramos, L. P. (2021). Lignin functionalization strategies and the potential applications of its derivatives – a review. *BioResources*, 16(3), 6471–6511. <https://doi.org/10.15376/biores.16.3.suota>
- Syamsiro, M., Saptoadi, H., & Pambudi, N. (2012). A preliminary study on use of cocoa pod husk as a renewable source of energy in Indonesia. *Energy for Sustainable Development*, 74-77. doi:https://doi.org/10.1016/j.esd.2011.10.005
- Thielemans, W., Can, E., Morye, S., & Wool, R. (2001). Novel applications of lignin in composite materials. *Journal of Applied Polymers Science*, 323-331. doi:https://doi.org/10.1002/app.2247
- Tiburcio, P. (2017). *Solid-state fermentation of Theobroma cacao pod husk using Rhizopus stolonifera - prospection of biomolecules*. Universidade Federal do Paraná: Thesis.
- Tolbert, A., Akinosho, H., Khunsupat, R., Naskar, A. K., & Ragauskas, A. J. (2014). Characterization and analysis of the molecular weight of lignin for Biorefining Studies. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 8(6), 836–856. <https://doi.org/10.1002/bbb.1500>
- Tsai, W., & Huang, P. (2018). Characterization of acid-leaching cocoa pod husk (CPH) and its resulting activated carbon. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 521-528. doi:https://doi.org/10.1007/s13399-018-0302-1
- Tursi, A. (2019). A review on biomass: importance, chemistry, classification, and conversion. *Biofuel research Journal*, 962-979. doi:10.18331/BRJ2019.6.2.3
- Valadez, L., Plazola, C., Hernández, M., Hernández, M., Villareal, F., Necoechea, H., Ceballos, G. (2017). Effects of microwaves, hot air and freeze-drying on the phenolic compounds, antioxidant capacity, enzyme activity and microstructure of cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 378-386. doi:https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.012
- Valladares, K., de Souza, L., Zevallos, L., Nishida, V., Filho, A., Woiciechowski, A., & Soccol, S. (2021). Imidazole green solvent pre-treatment as a strategy for second-generation bioethanol production from sugarcane bagasse. *Chemical Engineering Journal*. doi:https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127708

- Valladares-Diestra, K. K., Porto de Souza Vandenberghe, L., Zevallos Torres, L. A., Zandoná Filho, A., Lorenci Woiciechowski, A., & Ricardo Soccol, C. (2022). Citric acid assisted hydrothermal pretreatment for the extraction of pectin and xylooligosaccharides production from Cocoa Pod Husks. *Bioresource Technology*, 343, 126074. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126074>
- Van Hung Daud, Z., Mohd, A., Mohd, A., Awang, H., & Mohd, M. (2013). Chemical Composition and Morphological of Cocoa Pod Husks and Cassava Peels for Pulp and Paper Production. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 406-411.
- van Swaij, W., Kersten, S., & Palz, W. (2015). *Biomass Power for the World*. Jenny Stanford Publishing.
- Varejão, J. M. T. B. (2022). Biomass Structure and Disassembling. In *Biomass, bioproducts and biofuels* (pp. 4–38). Chapter, CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Vásquez Stark, N. M., Yelle, D. J., & Agarwal, U. P. (2016). Techniques for characterizing lignin. *Lignin in Polymer Composites*, 49–66. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-35565-0.00004-7>
- Vasquez, G., Freire, S., Rodriguez, C., Gonzhalez, J., & Antorrena, G. (1999). Acetosolv pine lignin as copolymer in resins for manufacture of exterior grade plywoods. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 357-378.
- Vásquez, Z., de Carvalho Neto, D., Pereira, G., Vandenberghe, L., P, d. O., Tiburcio, P., . . . Soccol, C. (2019). Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Management*, 72-83. doi:<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.04.030>
- Vishtal, A., & Kraslawski, A. (2011). Challenges in industrial applications of technical lignins. *BioResources*, 3547-3568.
- Wang, H., Pu, Y., Ragauskas, A., & Yang, B. (2019). From lignin to valuable products—strategies, challenges, and prospects. *Bioresource Technology*, 271, 449–461. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.072>
- Woiciechowski, A., Dalmas, C., de Souza, L., de Carvalho, D., Novak, A., Junior, L., . . . Soccol, C. (2020). Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance - Conventional processing and recent advances. *Bioresource Technology*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122848>
- Xu, G., Shi, Z., Zhao, Y., Deng, J., Dong, M., Liu, C., . . . Guo, Z. (2019). Structural characterization of lignin and its carbohydrate complexes

isolated from bamboo (*Dendrocalamus sinicus*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 376-384

- Yapo, B., Besson, V., Koubala, B., & Koffi, K. (2013). Adding Value to Cacao Pod Husks as a Potential Antioxidant-Dietary Fiber Source. *American Journal of Food and Nutrition*, 38-46. doi:10.12691/ajfn-1-3-4
- Yinghuai, Z., Tang, K., & S., N. (2013). Applications of ionic liquids in lignin chemistry. *Ionic Liquids - New Aspects for the Future*. <https://doi.org/10.5772/51161>
- Yoo, C. G., & Ragauskas, A. J. (2021). Opportunities and challenges of lignin utilization. *ACS Symposium Series*, 1–12. <https://doi.org/10.1021/bk-2021-1377.ch001>
- Yu, J., Paterson, N., Blamey, J., & Millan, M. (2017). Cellulose, xylan and lignin interactions during pyrolysis of lignocellulosic biomass. *Fuel*, 140-149. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.11.057>

## 3 CUANTIFICACIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO DE CÁSCARA DE MAZORCA DE CACAO DE TRES VARIEDADES

### 3.1 Resumen

La producción de combustibles y otros productos a partir de los recursos fósiles acarrea una serie de problemas económicos y socioambientales. Una de las alternativas que contribuirán a reducir la dependencia de los recursos fósiles y los inconvenientes de su uso, es la biomasa lignocelulósica. Continuamente, se ha incrementado el interés por esta materia prima para su conversión en biocombustibles y productos químicos, por lo tanto, el análisis composicional de las distintas fracciones de la biomasa lignocelulósica, permite conocer las proporciones de los diferentes constituyentes de este material, generando información necesaria para aprovechar de manera óptima estos recursos. Sumado a lo anterior, el aprovechamiento de biomasa residual o desechos derivados de la agroindustria, como materia prima de fácil disponibilidad, de amplia producción, hoy día adquiere cada vez más importancia. Una fuente atractiva para estos propósitos es la gran cantidad de biomasa residual, proveniente principalmente de la cáscara de la mazorca del cacao (CMC), durante el procesamiento del cacao (*Theobroma cacao L.*). Este residuo que permanece subexplotado, emerge como una como fuente de celulosa, hemicelulosa, lignina y otros subproductos de interés industrial. El objetivo de este trabajo consistió en cuantificar por métodos convencionales, las distintas fracciones de lignocelulósicas en la CMC de tres variedades de cacao cultivadas en Tabasco, México (carmelo, trinitario y forastero). Se observó que las variedades con mayor cantidad de sustancias extraíbles fueron carmelo y trinitario,  $23.8 \pm 0.9$  y  $24.7 \pm 0.78$  respectivamente, las variedades con mayor contenido de lignina fueron forastero y trinitario,  $26.3 \pm 0.56$  y  $25.3 \pm 0.06$  respectivamente, la variedad con mayor cantidad de celulosa fue forastero,  $28.7 \pm 0.05$ , la cantidad de hemicelulosa encontrada en las tres variedades fue igual mientras que la variedad con mayor cantidad de cenizas fue forastero,  $6.7 \pm 0.08$ .

**Palabras clave:** CMC, biomasa, celulosa, hemicelulosa, lignina

Tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Sebastián García Fernández

Director: Dr. Benito Reyes Trejo

## QUANTIFICATION OF LIGNOCELLULOSIC MATERIAL FROM COCOA POD HUSKS OF THREE COCOA VARIETIES

### Abstract

The production of fuels and other products from fossil resources entails a series of economic and socio-environmental problems. One of the alternatives that will contribute to reducing dependence on fossil resources and the disadvantages of their use is lignocellulosic biomass. The interest in this raw material for its conversion into biofuels and chemical products has continuously increased, therefore the compositional analysis of the different fractions of lignocellulosic biomass allows knowing the proportions of the different constituents of this material, generating the necessary information to take advantage of these resources in an optimal way. In addition to the above, the use of residual biomass or wastes derived from agroindustry, as a raw material of easy availability and wide production, is becoming more and more important nowadays. An attractive source for these purposes is the large amount of residual biomass, mainly from the cocoa pod husk (CPH), during the processing of cocoa (*Theobroma cacao* L.). This residue, which remains underexploited, emerges as a source of cellulose, hemicellulose, lignin and other by-products of industrial interest. The objective of this work was to quantify by conventional methods, the different lignocellulosic fractions in the CMC of three cocoa varieties grown in Tabasco, Mexico (carmelo, trinitario and forastero). It was observed that the varieties with the highest amount of extractable substances were carmelo and trinitario,  $23.8 \pm 0.9$  and  $24.7 \pm 0.78$  respectively, the varieties with the highest lignin content were forastero and trinitario,  $26.3 \pm 0.56$  and  $25.3 \pm 0.06$  respectively, the variety with the highest amount of cellulose was forastero,  $28.7 \pm 0.05$ , the amount of hemicellulose found in the three varieties was equal while the variety with the highest amount of ash was forastero,  $6.7 \pm 0.08$ .

**Keywords:** CPH, biomass, cellulose, hemicellulose, lignin

Tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología Agroalimentaria, Universidad  
Autónoma Chapingo

Autor: Sebastian García Fernández

Director: Dr. Benito Reyes Trejo

### 3.1 Introducción

La demanda de energía mundial ha aumentado en los últimos años, el uso excesivo de combustibles fósiles ha tenido efectos en la economía y en el medioambiente, principalmente por el incremento imprevisto de las emisiones de gases de efecto invernadero. El pronóstico de un inevitable agotamiento de los recursos petrolíferos fósiles se ha convertido en una razón importante para desarrollar el concepto de fuentes sostenibles de energía renovable y productos químicos (Kothari et al., 2022). En este contexto, la biomasa lignocelulósica, emerge como una materia prima esencial, dada su: renovabilidad biológica, buena disponibilidad y abundantes reservas (van Swaaij et al., 2015, Boro et al., 2022). Por otro lado, la generación de grandes cantidades de residuos orgánicos, actualmente etiquetados como biomasa residual, en algunos casos se ha convertido en un inconveniente de la agroindustria, ya que no se dispone de estrategias sólidas para el aprovechamiento de esta (Singh et al., 2021). Un ejemplo notable es la biomasa residual generada en la industria del cacao (Vásquez et al., 2019), si se tiene en cuenta que la producción anual de cacao es de aproximadamente 4.7 millones de toneladas de granos de cacao, de los cuales sólo el 10% corresponde al grano de cacao y los demás componentes corresponden en gran número a residuos como: la CMC, la pulpa, mucilago y la cascarilla del grano de cacao. En particular la CMC, la cual es liberada y desechada al abrir el fruto cosechado, representa cerca del 70-80% del peso seco del fruto entero (Prabhakaran, 2010). Este material es bastante prometedor como materia prima ya que en los últimos años, ha existido un constante interés para diversificar e implementar nuevos usos para este componente de la biomasa residual de la producción de granos de cacao.

El uso de estos residuos (CMC), se destaca principalmente como fuente de nutrientes y compuestos de interés en la industria alimentaria como posibles ingredientes, o incluso aditivos (de Souza et al., 2022). La idea actual consiste en usar la biomasa residual para fortalecer la cadena de valor del cacao, aumentar la rentabilidad económica del cultivo para los productores y reducir los

impactos ambientales. La biorrefinería es el concepto que engloba estos propósitos estableciendo como núcleo central la producción de biocombustible y productos químicos a partir de la biomasa, mediante un ciclo sostenible con un balance cero o muy cercano a cero con respecto al carbono, permitiendo así el desarrollo de una economía ambientalmente sostenible (Chávez, 2019). De manera general, los constituyentes sobresalientes de la biomasa lignocelulósica corresponden a celulosa (40-60%), hemicelulosa (20-40) y lignina (20-30%), con base en lo anterior, el primer paso para futuros aprovechamiento de cualquier material lignocelulósico, consiste en la determinación de dichos componentes dado que varían de acuerdo al tipo de planta (Saravanan et al., 2022). De acuerdo a lo anterior, en este trabajo se propone determinar las proporciones de los constituyentes principales de la biomasa lignocelulósica de cáscaras de mazorca de cacao, en tres distintas variedades de cacao cultivado en México. Esta información es indispensable para valorizar este material y ofrecerlo en un futuro, como una alternativa viable en el desarrollo y aplicación de nuevas fuentes de energía alternativa y renovable en México.

### **3.4 Materiales y métodos**

#### **3.4.1 Material vegetal**

Las cáscaras de la mazorca de cacao de las variedades caramelo, forastero y trinitario fueron adquiridos en la Ranchería Río Seco, en el municipio de Cunduacán, en el estado de Tabasco, México. [18°04'00"N y 93°10'00"W]. Las CMC fueron posteriormente trasladadas al laboratorio de productos naturales, departamento de preparatoria agrícola, Chapingo, Edo de México, México. A Las cáscaras se les retiro material ajeno a estas para posteriormente secarlas a temperatura ambiente por una semana para reducir su contenido de humedad. Las muestras de CMC para análisis se prepararon en concordancia con las normas TAPPI T264 cm-97, Preparation of Wood for chemical análisis; T257, Sampling and preparing Wood for analysis, estos métodos describen el procedimiento para preparar muestras de madera para análisis químicos y T204 cm-97, Solvent extractives of Wood and Pulp que describe el procedimiento para

determinar la cantidad de material soluble en disolvente, no volátil en madera. El procedimiento consistió en reducir el tamaño de partícula de las cáscaras por medio de molienda, luego el material se tamizó y se separó por tamaño de partícula (Figura 9). El tamaño seleccionado fue de 250  $\mu\text{m}$  (malla 60), este material secó hasta peso constante. El siguiente paso consistió en retirar los extraíbles de las cáscaras mediante el uso del sistema Soxhlet utilizando como disolventes hexano, diclorometano y metanol, utilizando 10 g de muestra seca. Por cada variedad se realizaron triplicados y un blanco. Los disolventes fueron eliminados a presión reducida en un rotavapor (Büchi® Rotavapor R-300, Suiza) obteniéndose extractos concentrados, los cuales fueron secados, pesados y almacenados (Figura 10). El material lignoceluloso de cáscaras molidas y libres de extraíbles, se secó y se pesó. Los resultados se expresaron en porcentaje en base seca. A partir de este material libre de extraíbles, se determinaron los contenidos de celulosa, holocelulosa, lignina.

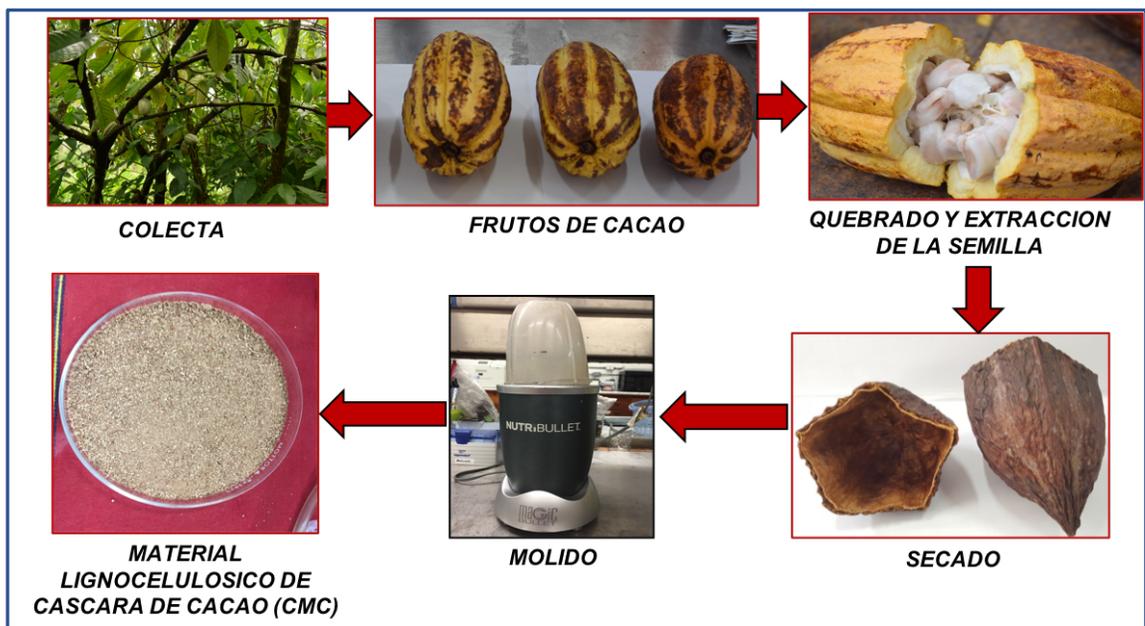


Figura 10. Proceso inicial de preparación de muestras de cascara de mazorca de cacao, obtención de material lignocelulósico seco y molido



Figura 11. Obtención de extraíbles de CMC.

### 3.4.2 Cuantificación de material lignocelulósico

#### 3.4.2.1 Lignina insoluble en ácido (Lignina Klason)

El primer componente a determinar fue la lignina, el procedimiento se realizó acorde a la norma TAPPI 222 om-02. El método más común y de fácil implementación es el método Klason. En este método los carbohidratos en la muestra son hidrolizados y solubilizados en ácido sulfúrico, la lignina insoluble en ácido es filtrada, secada y pesada. Por cada variedad de cáscara molida se realizaron triplicados. Se pesó  $1.0 \pm 0.1$  g de muestra libre de extraíbles y seca en un vaso de precipitados para posteriormente añadir gradualmente 15 mL ácido sulfúrico al 72%, con agitación constante. Los vasos con muestra se mantuvieron en baño de agua a  $2 \pm 1$  °C durante la dispersión de material. Después de que la muestra fue dispersada, el vaso de precipitados se cubrió con un vidrio de reloj y se mantuvo en baño de agua a  $20 \pm 1$  °C por dos horas. La muestra se agitó frecuentemente durante el tiempo señalado para garantizar una disolución completa. Después de haber transcurrido 2 horas se añadió 300 mL de agua destilada al vaso de precipitados y se transfirió la mezcla a un matraz bola de fondo plano de 1 L para luego aforar hasta un volumen total de 575 mL

alcanzando una concentración de 3%. El matraz bola fue colocado a ebullición por 4 horas en un sistema a reflujo. Después haber transcurrido ese tiempo la lignina precipitó en el fondo del matraz. La lignina fue filtrada en un embudo gooch con papel filtro previamente pesado, lavada con agua caliente aplicando vacío hasta que el residuo estuvo libre ácido según lo indicado por el papel tornasol. La lignina fue secada en estufa a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  hasta peso constante. La lignina fue enfriada en desecador para posteriormente ser pesada y almacenada (Figura 11). Los resultados se expresaron en porcentaje en base seca.

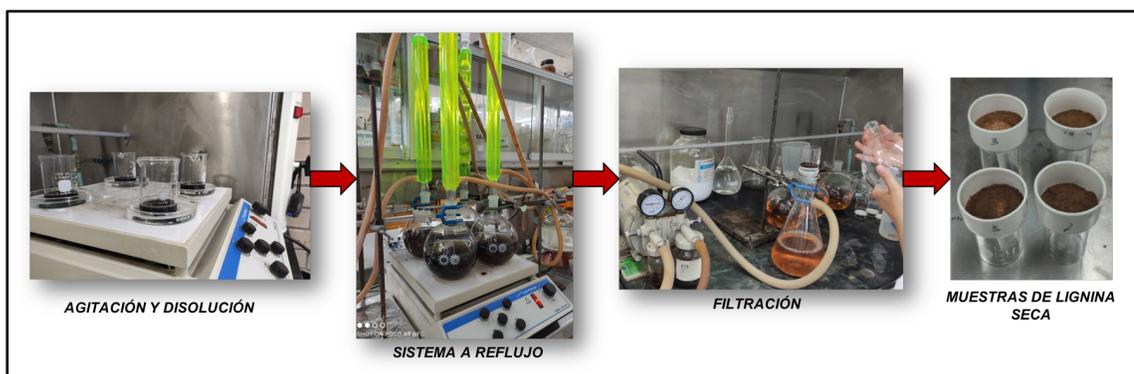


Figura 12. Proceso de obtención de lignina

### 3.4.2.2 Holocelulosa

La obtención de holocelulosa se realizó de acuerdo con la norma ASTM D1104 también conocido método de cloración, la cual define a la holocelulosa como la fracción de carbohidratos insolubles en agua de los materiales vegetales. Por cada variedad de cáscara se realizaron triplicados. Se pesó 2.5 g de cáscara molida ( $250 \mu\text{m}$ ) y libre de extraíbles. A la muestra, en un matraz Erlenmeyer, se le adicionaron 80 mL de agua destilada caliente, 0.5 ml de ácido acético y 1.0 g de clorito de sodio. El matraz se mantuvo tapado con un vidrio de reloj en baño de agua a  $75 \pm 5^\circ\text{C}$  durante una hora, agitando ocasionalmente. Después de haber transcurrido una hora, se volvió a añadir 0.5 ml de ácido acético y 1.0 g de clorito de sodio. Se repitió el procedimiento hasta acumular un total de 4 horas Al final de las 4 horas el matraz fue colocado en hielo para enfriarlo. El contenido del matraz se filtró al vacío a través de un papel filtro previamente pesado. El

material retenido en el papel filtro se lavó con agua fría destilada hasta eliminar el color amarillo y el olor a dióxido de cloro. El material fue lavado con agua destilada hasta que el residuo estuvo libre ácido según lo indicado por el papel tornasol y se secó en estufa a  $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante. La muestra se enfrió en desecador y se pesó. Los resultados se expresaron en porcentaje en base seca.

#### **3.4.2.3 Celulosa**

La obtención de celulosa se realizó de acuerdo con la norma ASTM D103-77. La holocelulosa libre de extraíbles y lignina es tratada con hidróxido de sodio y después con ácido acético, el residuo se define como  $\alpha$ -celulosa. Se pesaron 2 g de holocelulosa seca por triplicado por cada variedad. En baño de agua a  $20^{\circ}\text{C}$ , la muestra en un matraz Erlenmeyer se le agregaron 10 mL de NaOH al 17.5%, después de 2 minutos, se agitó constantemente con la ayuda de una varilla de vidrio. En intervalos de 5 minutos se adicionaron 5 mL de NaOH hasta un volumen final de 25 mL. Una vez utilizado el volumen total de NaOH, la mezcla se dejó reposar por 30 minutos haciendo un tiempo total de 45 minutos de tratamiento. Transcurrido ese tiempo se adicionaron 33 mL de agua destilada a  $20^{\circ}\text{C}$ , se mezcló y se dejó reposar una hora. Pasada una hora el material resultante se filtró al vacío en embudo gooch con un papel filtro previamente pesado, se lavó con una disolución de NaOH al 8.3%. Posteriormente se vertieron 15 mL de ácido acético al 10% liberando la succión para que el ácido acético pueda estar en contacto con el material por 3 minutos, transcurrido ese tiempo se reanuda la succión y se lavó con agua destilada hasta que el residuo estuvo libre ácido según lo indicado por el papel tornasol. La muestra fue secada en estufa a  $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante y enfriada en desecador para posteriormente ser pesada. Los resultados se expresaron en porcentaje en base seca.

#### **3.4.2.4 Cuantificación de ceniza**

La cuantificación de ceniza se realizó por triplicado por variedad analizada. Cuatro gramos de CMC seca fueron colocados en crisoles limpios y previamente pesados, dichos crisoles fueron introducidos a una mufla (marca Barnstead/Thermolyne Benchtop Muffle Furnaces, Type 47900) durante 6 horas a 650 °C. Los crisoles fueron enfriados en desecador para posteriormente ser pesados. Los resultados se expresaron en porcentaje en base seca.

#### **3.4.3 Análisis estadístico**

Para la cantidad de extraíbles, lignina klason, holocelulosa, celulosa y ceniza se realizó un análisis de varianza (diseño completamente al azar con tres repeticiones) con el objetivo de identificar diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre las variedades. Se empleó la prueba de comparación de medias de Tukey. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EE. UU).

### **3.5 Resultados y discusión**

#### **3.5.1 Cuantificación del material lignocelulósico**

Los resultados de la cuantificación del material lignocelulósico de cascara de cacao se muestra en el Cuadro 6. La cantidad de sustancias extraíbles en las variedades caramelo y trinitario fueron muy similares, no mostrando diferencias significativas, pero diferenciándose en una cantidad mayor a los de la variedad forastero, encontrándose diferencia significativa en el contenido de extraíbles entre la variedad caramelo y trinitario con la variedad forastero. Como es conocido, el contenido exacto de las diferentes mezclas de extraíbles, depende de varios factores, aunque en general se pueden encontrar ceras, grasas, resinas, fitoesteroles, hidrocarburos no volátiles, carbohidratos de bajo peso molecular, sales y otras sustancias solubles en agua (TAPPI, 1997). En este caso el material analizado corresponde a variedades de una misma especie de planta (*Theobroma cacao, L.*). La diferencia puede asociarse a lugar geográfico, que a

pesar de estar en zonas aledañas, siempre hay variaciones en la calidad de suelo. Con respecto al árbol en el cual se cortó el fruto, no se determinó la edad y el índice de madurez del fruto. Por lo tanto es casi imposible afirmar con precisión el factor determinante en la diferencia de extraíbles en las variedades.

El porcentaje de lignina aislada para la CMC de la variedad carmelo resulto ser menor a las otras dos variedades analizadas, mientras que para las variedades forastero y trinitario resulto ser similar, no encontrándose diferencias significativas. El porcentaje de lignina aislado para las tres variedades concuerda con los rangos encontrados en la literatura para CMC, yendo de 6.7 a 30.18%. En el caso de la celulosa, las tres variedades fueron diferentes significativamente, siendo la variedad con mayor cantidad la variedad forastero, seguida de carmelo y por último trinitario. El porcentaje de celulosa en las tres variedades, concuerda con los rangos encontrados en la literatura para CMC, yendo de 15.14 a 35.4%. Para caso de la hemicelulosa no se encontró diferencia significativa entre las variedades. El porcentaje de hemicelulosa concuerda con el rango de valores encontrados en la literatura que van de 11.0 a 38.08 %. Mientras que para el caso de las cenizas las tres variedades son diferentes significativamente entre sí, la variedad que presentó una mayor cantidad fue la variedad Forastero, seguido de trinitario y por último carmelo. El porcentaje de cenizas concuerda con el rango encontrado en la literatura que va de 3.7 a 15%. Nuevamente, la diferencia entre los valores obtenidos entre las variedades, comparada con otras determinaciones previas, son de origen multifactorial (Sandesh et al., 2020) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Cuantificación del material lignocelulósico de tres distintas variedades de CMC

<b>Variedad</b>	<b>Extraíbles (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Celulosa (%)</b>	<b>Hemicelulosa (%)</b>	<b>Cenizas (%)</b>
<b>Carmelo</b>	23.8 ± .09 a	23.6 ± 0.91 b	28.1 ± 0.14 a	16.5 ± 0.99 a	4.6 ± 0.2 b
<b>Forastero</b>	20.8 ± 0.15 b	26.3 ± 0.56 a	28.7 ± 0.05 b	16.8 ± 0.09 a	6.7 ± 0.08 a
<b>Trinitario</b>	24.7 ± 0.78 a	25.3 ± 0.06 a	27.9 ± 0.05 c	16.3 ± 0.04 a	5.2 ± 0.10 c

Promedios (n=3) ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa. (Tukey,  $p < 0.05$ )

La comparación con otros trabajos reportados (Cuadro 7), incluye algunos de estos factores por ejemplo: Dahunsi et al. (2019) utilizaron CMC proveniente de Nigeria y no especifican la variedad, mientras que Valladares-Diestra et al. (2022) utilizaron CMC de la variedad forastero proveniente de Brasil, en ambos casos se empleó la metodología de Sluiter et al. (2008a) para la cuantificación de ceniza; Sluiter et al. (2008b), para la determinación de extraíbles y Sluiter et al., (2012) para la determinación de carbohidratos estructurales y lignina. Los dos primeros métodos mencionados guardan cierta similitud con los empleados en este trabajo, sin embargo, el último método se apoya en métodos de separación y análisis por HPLC y estándares para llevar a cabo la cuantificación. Daud et al. (2013) utilizaron CMC de Malasia y los métodos utilizados son similares a los usados en este trabajo. Asiedu et al. (2019) utilizaron CMC de Ghana y utilizaron los métodos de Van Soest y el método de Crampton y Maynard para el contenido de celulosa. Sandesh et al. (2020) utilizaron CMC de India, para la determinación de celulosa y lignina utilizaron el protocolo descrito en Sharma y Sangha (2009), el contenido de cenizas de acuerdo con el procedimiento estándar de la AOAC (1990) y la cantidad de hemicelulosa mediante el método descrito en Mertens (2003). Redgwell et al. (2003) utilizaron CMC de Nigeria y emplearon los métodos gravimétricos de AOAC (1984).

De acuerdo a lo anterior la diversidad de metodologías hace imposible que se puedan determinar valores homogéneos o muy discriminantes, para los componentes químicos del material lignocelulósico de cáscara de mazorca de cacao. A pesar de ello, los valores para estos componentes del material estudiado en este trabajo, convergen en lo rangos comunes de los otros estudios previos.

Cuadro 7. Composición química de CMC, comparación con trabajos previos

Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Cenizas (%)	Extraíbles (%)	Referencia
35.0	11.0	14.6	9.1	6.1	(Campos-Vega et al., 2018)
31.7	27.0	21.7	3.7	16.8	(Dahunsi et al., 2019)
15.45	11.47	30.18	8.35	33.46	(Valladares-Diestra et al., 2022)
32.3	21.4	6.7	15		(Vriesmann et al., 2017)
35.4	37	14.7	12.3	17.6	(Daud et al., 2013)
23.04	38.08	18.19			(Asiedu et al., 2019)
28.25	16.75	24.16	9.07		(Sandesh et al., 2020)
34	22.4	27.9			(Redgwell et al., 2003)
24.4	11.0	26.38		10.02	(Vásquez et al., 2019)
28.1	16.5	23.6	4.6	23.8	<b>Carmelo<sup>a</sup></b> Este trabajo
28.7	16.8	26.3	6.7	20.8	<b>Forastero<sup>a</sup></b> Este trabajo
27.9	16.3	25.3	5.2	24.7	<b>Trinitario<sup>a</sup></b> Este trabajo

a. Valores promedio (n=3) sin incluir la desviación estándar.

### 3.5 Conclusión

Se evaluaron las cantidades de los distintos componentes de la biomasa lignocelulósica de las cáscaras de la mazorca de cacao de las variedades Carmelo, Forastero y Trinitario. Las tres variedades mostraron ligeras variaciones en cuanto a la cantidad de sustancias extraíbles, respecto al contenido de celulosa las tres variedades resultaron diferentes, contrario a la cantidad de hemicelulosa donde las tres variedades son similares, en el caso de la cantidad de cenizas las tres variedades resultaron ser diferentes, respecto a la cantidad de lignina, las variedades Forastero y Trinitario son similares, por encima de la variedad Carmelo. Dado que la celulosa y lignina en las tres variedades son el primer y el segundo componente mayoritario respectivamente, se logró vislumbrar el potencial de las cáscaras de la mazorca de cacao de las variedades

analizadas como una fuente rica en materiales biopoliméricos de carbohidratos y biopoliméricos de sistemas aromáticos como la lignina.

### 3.6 Literatura citada

- Adjin, M., Asiedu, N., Dodoo, D., Karam, A., & Amaniampong, P. (2018). thermochemical conversion and characterization of cocoa pod husks a potential agricultural waste from Ghana. *Industrial Crops and Products*, 304- 312. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.060>
- AOAC. (1984). *Official methods of analysis* (14th ed.). Washington, DC, USA: Association of official Analytical chemists
- Asiedu, N. Y., Neba, F. A., & Addo, A. (2019). Modeling the attainable regions for catalytic oxidation of renewable biomass to specialty chemicals: Waste Biomass to carboxylic acids. *South African Journal of Chemical Engineering*. doi:10.1016/j.sajce.2019.07.003
- ASTM. (1956). Method of Test for Holocellulose in Wood D1104.
- ASTM. (1977). ATMD D103-77.
- Becker, J. (2012). Plasmons as sensors. *Assoc. Anal Communities*, 141–144 <https://doi.org/10.1007/978-3-642-31241-0>.
- Boro, M., Verma, A. K., Chettri, D., Yata, V. K., & Verma, A. K. (2022). Strategies involved in biofuel production from agro-based lignocellulose biomass. *Environmental Technology & Innovation*, 28, 102679. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102679>
- Campos, R., Nieto, K., & Oomah, B. (2018). Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 172-184. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.022>
- Chávez, M. (2019). La biomasa: fuente alternativa de combustibles y compuestos químicos. *Anales de Química*, 399-407.
- de Souza, L., Valladares, K., Amaro, G., Murawski, F., Vásquez, Z., Zwiercheczewski, P., . . . Soccol, R. (2022). Added-value biomolecules' production from cocoa pod husks: A review. *Bioresource Technology*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126252>
- Dahunsi, S., Adesulu-Dahunsi, A., & Izebere, J. (2019). Cleaner energy through liquefaction of Cocoa (*Theobroma cacao*) pod husk: Pretreatment and process optimization. *Journal of Cleaner Production*, 578-588. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.112>

- Daud, Z., Mohd, A., Mohd, A., Awang, H., & Mohd, M. (2013). Chemical Composition and Morphological of Cocoa Pod Husks and Cassava Peels for Pulp and Paper Production. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 406-411.
- Kothari, R., Singh, A., & Arora, N. K. (Eds.). (2022). *Biomass, Bioenergy & Bioeconomy*. SPRINGER VERLAG, SINGAPOR.
- Kumar, B., Bhardwaj, N., Agrawal, K., Chaturvedi, V., & Verma, P. (2020). Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: an emerging biorefinery concept. *Fuel Processing Technology*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.106244>
- Prabhakaran, K. (2010). 5 - Cocoa (*Theobroma cacao* L.). En K. Prabhakaran, *The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World* (págs. 131-180). Elsevier. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384677-8.00005-9>
- Redgwell, R., Trovato, V., Merinat, S., Curti, D., Hediger, S., & Manez, A. (2003). Dietary fibre in cocoa shell: characterization of component polysaccharides. *Food Chemistry*, 81(1), 103–112. doi:10.1016/s0308-8146(02)00385-0
- Saravanan, A., Senthil Kumar, P., Jeevanantham, S., Karishma, S., & Vo, D.-V. N. (2022). Recent advances and sustainable development of biofuels production from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 344, 126203. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126203>
- Singh, D. V., Bhat, R. A., & Geelani, S. M. (2021). Agricultural waste: Sources, implications, and Sustainable Management. *Agricultural Waste*, 1–13. <https://doi.org/10.1201/9781003105046-1>
- Statista, 2021. Global cocoa bean production in 2018/19 and 2020/21, by country [WWW Document]. Statistica. URL <https://www.statista.com/statistics/263855/cocoa-bean-production-worldwide-by-region/> (accessed 10.25.22)
- Sandesh, K., Shishir, R., & Vaman Rao, C. (2020). Optimization and comparison of induction heating and LPG assisted acid pretreatment of cocoa pod for ABE fermentation. *Fuel*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116499>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., (2008a). Determination of ash in Biomass. Laboratory Analytical Procedures (LAP). Natl. Renew Energy Lab. 1e8 Report No. TP-510-42622.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., (2012). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in BIOMASS. Laboratory Analytical Procedures (LAP). Natl. Renew Energy Lab. 1e18 Report No. TP-510-42618.

- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., (2008b). Determination of Extractives in Biomass. Laboratory Analytical Procedures (LAP). Natl. Renew. Energy Lab. 1e12 Report No. TP-510-42619.
- Soares, T. F., & Oliveira, M. B. (2022). Cocoa by-products: Characterization of bioactive compounds and beneficial health effects. *Molecules*, 27(5), 1625. <https://doi.org/10.3390/molecules27051625>
- TAPPI. (1997). Preparation of Wood for chemical análisis T 264 CM-97.
- TAPPI. (1997). Solvent extractives of wood and pulp T 204 cm-97.
- TAPPI. (2002). Acid-insoluble lignin in wood and pulp T 222 om-02.
- Valladares-Diestra, K. K., Porto de Souza Vandenberghe, L., Zevallos Torres, L. A., Zandoná Filho, A., Lorenci Woiciechowski, A., & Ricardo Soccol, C. (2022). Citric acid assisted hydrothermal pretreatment for the extraction of pectin and xylooligosaccharides production from Cocoa Pod Husks. *Bioresource Technology*, 343, 126074. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126074>
- Vásquez, Z., de Carvalho, D., Pereira, V., Vandenberghe, L., de Oliveira, P., Tiburcio, P., . . . Soccol, C. (2019). Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Management*, 72-83. doi:<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.04.030>
- Vriesmann., L., & de Oliveira, C. (2017). Cacao pod husks as a source of low-methoxyl, highly acetylatedpectins able to gel in acidic media. *International Journal of Biological Macromolecules*, 146-152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.082>

## 4 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LIGNINAS AISLADAS DE CASCARA DE LA MAZORCA DE CACAO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

### 4.1 Resumen

La lignina es el biopolímero con estructura aromática más abundante, a partir de esta se pueden obtener combustibles y químicos, sin embargo, la estructura de la lignina condiciona su uso final, además, la estructura de esta varía de acuerdo con la fuente y al método de extracción. La cáscara de la mazorca de cacao (CMC) es una fuente de lignina infra explotada. Conocer la estructura de la lignina proporciona la información para proponer estrategias para valorizar a la CMC como fuente de lignina para distintos procesos de transformación de esta. El objetivo consistió en aislar lignina de la cáscara de la mazorca de cacao de tres distintas variedades (carmelo, forastero y trinitario) por métodos diferentes de extracción (klason y organosolv) y mediante el análisis espectroscópico por FTIR comparar las estructuras encontradas en estas. La cantidad de lignina extraída de la CMC de la variedad carmelo por el método klason fue de  $23.69 \pm 0.91$ , Pereira et al., 2017  $8.33 \pm .012$ , Saha et al., 2019  $7.67 \pm 0.01$ . La cantidad de lignina extraída de la CMC de la variedad forastero por el método klason fue de  $26.33 \pm 0.56$ , Pereira et al., 2017  $9.42 \pm 0.12$ , Saha et al., 2019  $8.40 \pm 0.90$ . La cantidad de lignina extraída de la CMC de la variedad trinitario por el método klason fue de  $25.39 \pm 0.06$ , Pereira et al., 2017  $8.25 \pm 0.89$ , Saha et al., 2019  $9.01 \pm 0.47$ . Las ligninas fueron caracterizadas por espectroscopia infrarroja encontrándose en todos los casos bandas que se asociaron a bandas a los estiramientos de los grupos hidróxido (-OH), metil y metileno (C-H), anillos aromáticos (C=C), grupos ácido carboxílico y cetona (C=O).

**Palabras clave:** CMC, lignina, FTIR, klason, organosolv

Tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología Agroalimentaria, Universidad  
Autónoma Chapingo  
Autor: Sebastián García Fernández  
Director: Dr. Benito Reyes Trejo

## **STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF LIGNINS ISOLATED FROM COCOA POD HUSK BY INFRARED SPECTROSCOPY**

### **Abstract**

Lignin is the most abundant biopolymer with aromatic structure, from which fuels and chemicals can be obtained; however, the structure of lignin conditions its final use, and its structure varies according to the source and extraction method. Cocoa Pod husk (CPH) is an under-exploited source of lignin. Knowing the structure of lignin provides information to propose strategies to valorize CPH as a source of lignin for different lignin transformation processes. The objective was to isolate lignin from cocoa pod shells of three different varieties (carmelo, forastero and trinitario) by different extraction methods (klason and organosolv) and by FTIR spectroscopic analysis to compare the structures found in them. The amount of lignin extracted from CPH of the carmelo variety by the klason method was  $23.69 \pm 0.91$ , Pereira et al., 2017  $8.33 \pm .012$ , Saha et al., 2019  $7.67 \pm 0.01$ . The amount of lignin extracted from CPH of forastero variety by klason method was  $26.33 \pm 0.56$ , Pereira et al., 2017  $9.42 \pm 0.12$ , Saha et al., 2019  $8.40 \pm 0.90$ . The amount of lignin extracted from the CPH of the trinitario variety by the klason method was  $25.39 \pm 0.06$ , Pereira et al., 2017  $8.25 \pm 0.89$ , Saha et al., 2019  $9.01 \pm 0.47$ . The lignins were characterized by infrared spectroscopy finding in all cases bands that were associated with bands to stretches of hydroxyl (-OH), methyl and methylene (C-H) groups, aromatic rings (C=C), carboxylic acid and ketone (C=O) groups.

**Keywords:** CPH, lignin, FTIR, klason, organosolv

Tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Sebastián García Fernández

Director: Dr. Benito Reyes Trejo

## **4.2 Introducción**

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo económicamente importante en países en desarrollo (Lu et al., 2018). La producción de cacao en 2019-2020 fue de 4,735 millones de toneladas en todo el mundo, siendo el continente africano el que aporta mayor cantidad 74.9 %, seguido de América con 19.1 % y Asia y Oceanía con 6% (International Cocoa Organization , 2022). Durante el procesamiento del cacao, se desecha entre el 70% y el 80% de la fruta como biomasa residual, incluidas las cáscaras de la mazorca de cacao (CMC) (de Souza et al., 2022). En otras palabras, se generan diez toneladas de CMC húmedo por cada tonelada de cacao en grano seco (Vriesmann et al., 2011). Esta generación a gran escala de biomasa residual representa un problema medioambiental crítico para los países productores de cacao (Vásques et al., 2019). La CMC está infra explotada como recurso renovable rico en lignina (Yapo et al., 2013). La lignina tiene un gran potencial en diferentes industrias como fuente de productos químicos, combustibles y otros bioproductos (Welker et al., 2015), el aprovechamiento de estos subproductos podría generar ingresos para los agricultores, promoviendo así el desarrollo económico (Vriesmann et al., 2011).

La lignina es una macromolécula natural con polifenoles entrecruzados, la compleja estructura del polímero contiene grupos metoxi, grupos hidroxilos fenólicos y algunos grupos aldehídos terminales en las cadenas laterales (Zhang & Naebe, 2021). Las unidades de la lignina son principalmente tres monolignoles, el alcohol p-cumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico (Lee et al., 2014). Los anillos aromáticos presentes abundantemente en la lignina en forma de unidades básicas de fenilpropano (Lu et al., 2017), son responsables de la

propiedad antioxidante (Zhang & Naebe, 2021), Las unidades de fenilpropano están unidas por una serie de enlaces característicos, como  $\beta$ -O-4,  $\beta$ -5 y  $\beta$ - $\beta'$ , La lignina contiene tres tipos de fenilpropanoides: p-hidroxifenilo (H), guayacol (G) y siringilo (S) (Halpin, 2004; Haque et al., 2018; Haque et al., 2021)(Figura 12), además, la estructura química de la lignina depende de la especie vegetal y el método de extracción (Glasser & Sarkanen, 1989).

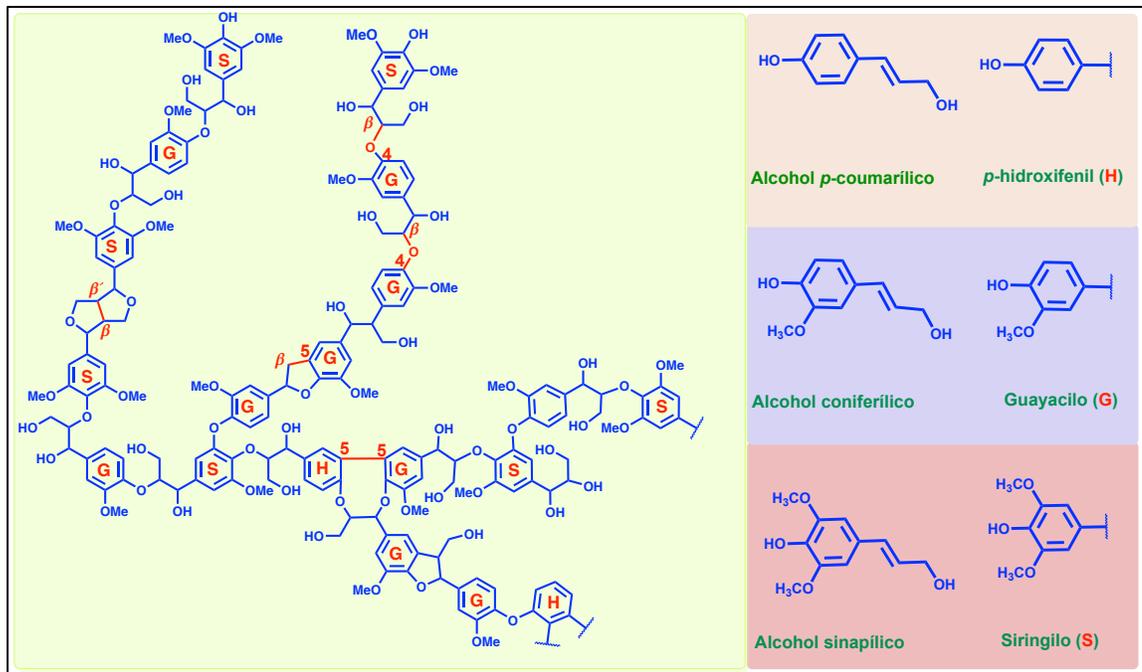


Figura 13. Estructura química de la lignina, modificado de Prieur et al., 2017. Los enlaces  $\beta$ -O-4,  $\beta$ -5 y  $\beta$ - $\beta'$  están marcados en rojo (Zhang & Naebe, 2021)

La caracterización molecular de la lignina es difícil debido a que esta es una red de macromoléculas enlazadas covalentemente a polisacáridos en la pared celular y es solamente parcialmente soluble en un rango amplio de disolventes (Holtman et al., 2010). La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) es una técnica versátil, rápida y confiable en la caracterización de ligninas (Faix, 1992).

La espectroscopia IR es la técnica más utilizada en el análisis de grupos funcionales. Su determinación se basa en las sustancias analizadas que contienen cromóforos. Esta técnica es competente tanto para muestras sólidas como para soluciones de disolventes orgánicos y sólo requiere

una cantidad muy pequeña de muestra. Es una técnica no destructiva, no invasiva, de alta sensibilidad, sencilla y rápida. Sin embargo, uno de los retos en la caracterización de la estructura de la lignina por espectroscopia IR es que las bandas fuertes de los compuestos residuales no lignínicos se superponen a las bandas características de la lignina. El Cuadro 9 enumera la absorción IR de la estructura típica de la lignina. La absorción IR a 1515  $\text{cm}^{-1}$  se utiliza a menudo para la determinación cuantitativa de lignina (Kolboe y Ellefsen 1962). El FTIR junto con la reflectancia total atenuada (ATR) puede utilizarse para la evaluación de las características estructurales de la lignina en diferentes pretratamientos y etapas de crecimiento (Koivu et al. 2016; Santoni et al. 2015; Yang et al. 2012). Los análisis cualitativos y cuantitativos rápidos y precisos mediante el uso de espectroscopia IR se aplican a menudo para los derivados de la lignina, por ejemplo, las ligninas oxietiladas (Passauer et al. 2016). La espectroscopia FTIR se considera una forma rápida y eficiente de analizar la lignina de las biorrefinerías sin pretratamiento de la muestra (Le et al. 2017). Las señales de los contaminantes (celulosa, hemicelulosas y sílice) pueden filtrarse matemáticamente.

### **4.3 Materiales y métodos**

#### **4.3.1 Material vegetal**

Las cascaras de la mazorca de cacao de las variedades caramelo, forastero y trinitario fueron adquiridos en la zona de Río Seco y ranchos cercanos, en el municipio de Cunduacán, en el estado de Tabasco, México. [ $18^{\circ}04'00''\text{N}$  y  $93^{\circ}10'00''\text{W}$ ]. Las CMC se trasladaron al laboratorio de productos naturales, Departamento de Preparatoria Agrícola, Chapingo, Edo de México, México. A las cascaras se les retiro el material remanente de mucilago, seguidamente se las se secaron a temperatura ambiente por una semana para reducir su contenido de humedad. La preparación de las muestras para los pretratamientos y análisis se efectuó por aplicación de las normas TAPPI T264 cm-97, Preparation of Wood for chemical análisis; T257, Sampling and preparing Wood for analysis, y T204

cm-97, Solvent extractives of Wood and Pulp. El pretratamiento inicial del material lignocelulósico (CMC), consistió en la reducción de tamaño mediante molienda, seguidamente se seleccionó una malla de 60 para tamizar el material molido, obteniéndose un tamaño de partícula de 250  $\mu\text{m}$ , este material se secó hasta peso constante. El siguiente paso fue retirar los extraíbles de las cáscaras mediante el uso del sistema Soxhlet, utilizando como disolventes hexano, diclorometano y metanol, utilizando 10 g de muestra seca. Por cada variedad se realizó el protocolo por triplicado y un blanco. Los disolventes se eliminaron a presión reducida en un rotavapor (Büchi® Rotavapor R-300, Suiza) obteniéndose extractos concentrados, los cuales fueron secados, pesados y almacenados. El sólido remanente (cáscaras molidas y libres de extraíbles), se secó y almaceno para los tratamientos y análisis. Adicional a las cáscaras de cacao se adquirió aserrín de madera de pino silvestre, adquirido en el municipio de Texcoco Estado de México y lignina Kraft adquirido de Sigma Aldrich ®.

#### **4.3.2 Extracción de lignina insoluble en ácido (lignina Klason)**

La obtención de lignina se realizó acorde a la norma TAPPI 222 om-02. En este método los carbohidratos en la muestra son hidrolizados y solubilizados en ácido sulfúrico, la lignina insoluble en ácido es filtrada, secada y pesada. Por cada variedad de cáscara molida se realizaron triplicados. Se pesó  $1.0 \pm 0.1$  g de muestra libre de extraíbles y seca en un vaso de precipitados para posteriormente añadir gradualmente 15 mL ácido sulfúrico al 72% mientras se agitaba con una varilla de vidrio. Los vasos con muestra se mantuvieron en baño de agua a  $2 \pm 1$  °C durante la dispersión de material. Después de que la muestra fue dispersada, el vaso de precipitados se cubrió con un vidrio de reloj y se mantuvo en baño de agua a  $20 \pm 1$  °C por dos horas. La muestra se agitó frecuentemente durante el tiempo señalado para garantizar una disolución completa. Después de este tiempo, se añadieron 300 mL de agua destilada al vaso de precipitados para transferir el material a un matraz bola de fondo plano de 1 L y luego aforar hasta un volumen total de 575 mL. El matraz bola fue colocado a ebullición por 4 horas en un sistema a reflujo, obteniéndose el precipitado en el fondo del matraz, una

vez transcurrido este tiempo. La lignina fue filtrada al vacío en un embudo gooch con papel filtro previamente pesado, se lavó con agua caliente hasta que el residuo estuvo libre ácido según lo indicado por el papel tornasol. La lignina fue secada en estufa a  $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante. Finalmente, la lignina fue colocada en un desecador para posteriormente ser pesada y almacenada. El procedimiento también se realizó para el aserrín de madera de pino.

#### **4.3.3 Extracción de lignina Organosolv por el método propuesto por Pereira et al., 2017**

La extracción de lignina Organosolv se realizó de acuerdo con el procedimiento utilizado por Pereira et al. (2017). Por cada variedad se realizaron triplicados. Se pesaron cinco gramos de cáscara seca, molida, y libre de extraíbles, esta cantidad de material se colocó en un matraz bola de fondo plano a ebullición en un sistema a reflujo en una mezcla de etanol/ agua (75/15, v/v), más 3 mL de ácido sulfúrico como catalizador durante 24 horas, para obtener una disolución rica en lignina. La mezcla se filtró en embudo gooch con un papel filtro para retirar la cascara residual. La disolución rica en lignina fue concentrada a presión reducida en un rotavapor (Büchi® Rotavapor R-300, Suiza). Seguidamente se le añadió agua para promover la precipitación de la lignina, el precipitado obtenido se filtró en un filtro gooch con un papel filtro previamente pesado, se hicieron varios lavados con agua destilada hasta confirmar la ausencia de ácido por medio de lo observado en el papel tornasol. La lignina se secó en estufa a  $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante y colocada en un desecador para posteriormente ser pesada, los resultados se expresaron en porcentaje en base seca.

#### **4.3.4 Extracción de lignina Organosolv por el método propuesto por Saha et al., 2019**

La segunda extracción de lignina Organosolv se realizó de acuerdo con el procedimiento utilizado por Saha et al. (2019). Por cada variedad se realizaron triplicados. Se pesaron 10 gramos de cáscara seca, molida, y libre de extraíbles, se colocaron en un sistema de extracción soxhlet. La mezcla utilizada de

disolvente fue de 0,4% v/v de HCl y 3% v/v de agua en 1,4-dioxano. Se añadió una pequeña cantidad de agua para evitar la formación de peróxido, mientras que la adición de HCl se recomienda para aumentar el rendimiento. La extracción se realizó hasta que no se observaba algún color en la mezcla que se depositaba en la cámara de extracción. Como resultado se obtuvo una disolución de dioxano rica en lignina, esta disolución fue concentrada a presión reducida en un rotavapor (Büchi® Rotavapor R-300, Suiza). La lignina fue precipitada añadiendo agua tibia/cloruro de amonio, en una proporción de (7:1) (Persson, 1949; Witcraft, 1949; Pepper et al., 1959). La lignina fue filtrada en un embudo gooch con un papel filtro previamente pesado, se lavó con agua destilada hasta que el residuo estuvo libre ácido según lo indicado por el papel tornasol, fue secada en estufa a  $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante. La lignina fue enfriada en desecador para posteriormente ser pesada y almacenada. Los resultados se expresaron en porcentaje en base seca.

#### **4.3.5 Acetilación de ligninas klason**

Para derivatizar la lignina se realizó una reacción de acetilación, sobre la lignina tipo klason de las tres variedades de CMC, igualmente la lignina del aserrín de pino. El procedimiento se hizo a microescala colocando 80 mg de lignina, 0.175 mL de trietilamina ( $\text{Et}_3\text{N}$ ), más 0.11 mL de cloruro de acetilo ( $\text{CH}_3\text{COCl}$ ) disueltas en 7 mL de diclorometano, la mezcla de reacción se colocó por 24 horas en agitación a temperatura ambiente. Al término de la reacción de acetilación, se filtró la fase líquida orgánica en un embudo Hirsch, con papel filtro para retener los restos de material sólido insoluble. A la fase orgánica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) se le realizaron 3 lavados con agua destilada, seguidamente se secó con sulfato de sodio anhidro y luego se eliminó el disolvente a presión reducida en un rotavapor (Büchi® Rotavapor R-300, Suiza), la muestra se obtuvo como un líquido vítreo y se almacenó para análisis posteriores.

#### **4.3.6 Análisis espectroscópico por FTIR-ATR**

Todos los espectros de infrarrojo fueron adquiridos por medio de un equipo FTIR Cary 630 Agilent Technologies, equipado con un módulo ATR en un método en el cual se aplicaron 128 Scans y una resolución de 0.16. Se caracterizaron mediante Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared (ATR FT-IR), las ligninas aisladas por tres métodos de extracción, Klason, (Pereira et al., 2017) y (Saha et al., 2019), para las CMC de las variedades carmelo, forastero y trinitario, además, se adquirieron espectros de lignina Kraft de Sigma Aldrich® como patrón de referencia y lignina Klason de aserrín de madera de pino. además, se realizó la caracterización de ligninas klason acetiladas de las tres variedades de CPH y aserrín de pino.

#### **4.4 Resultados y discusión**

##### **4.4.1 Obtención de ligninas tipo Klason y Organosolv**

Inicialmente se llevó a cabo el aislamiento y obtención de lignina por tres diferentes métodos (Figura 13), los rendimientos de las ligninas aisladas de CMC de distintas variedades por diferentes métodos, se muestran en el Cuadro 8 expresados en porcentaje con respecto a la base seca. El porcentaje de lignina klason obtenido de las tres variedades concuerda con los rangos encontrados en la literatura para CMC, yendo de 14.6 a 27. 9% (Asiedu et al., 2019; Sandesh et al., 2020; Redgwell et al., 2003; Vasques et al., 2019; Campos et al., 2018). Actualmente no se encuentran reportados en la literatura valores de lignina aislada de CMC por los métodos organosolv propuestos por Pereira et al. (2017) y Saha et al. (2019) ya que estos son métodos más recientes. En el trabajo de Pereira et al. (2017) para cáscara de arroz se obtuvo un rendimiento de 10.72 con el método propuesto, mientras que utilizando el método Klason obtuvieron  $22.35 \pm 1.2\%$  de lignina.

Si se comparan los datos obtenidos en este trabajo para la lignina de CMC de las distintas variedades extraídas por el método organosolv-I, se puede afirmar que estos subestiman la cantidad de lignina al igual a lo ocurrido en cascara de arroz.

Cuadro 8. Rendimiento de extracción de lignina de tres métodos diferentes en tres CMC de distintas variedades

Variedad	Método	Pereira et al. (2017)	Saha et al. (2019)
	Klason (%)	(%)	(%)
<b>Carmelo</b>	23.69 ± 0.91	8.33 ± .012	7.67 ± 0.01
<b>Forastero</b>	26.33 ± 0.56	9.42 ± 0.12	8.40 ± 0.90
<b>Trinitario</b>	25.39 ± 0.06	8.25 ± 0.89	9.01 ± 0.47

En el caso del método organosolv-II, se reporta un rendimiento de 15% de lignina para los residuos del descortezado de bambú en la industria papelera mientras que Sasaki et al. (2013) reporta para bambú crudo un contenido de 25.9 % de lignina Klason. Si bien no se trata de las mismas características en el bambú analizado, los datos sugieren que es menor el rendimiento del método organosolv-II propuesto por Saha et al. (2019). De acuerdo con lo anterior, el contenido de lignina obtenido por métodos diferentes y en variedades distintas de CMC es alto, por lo cual se considera a este material como una fuente potencial de lignina.

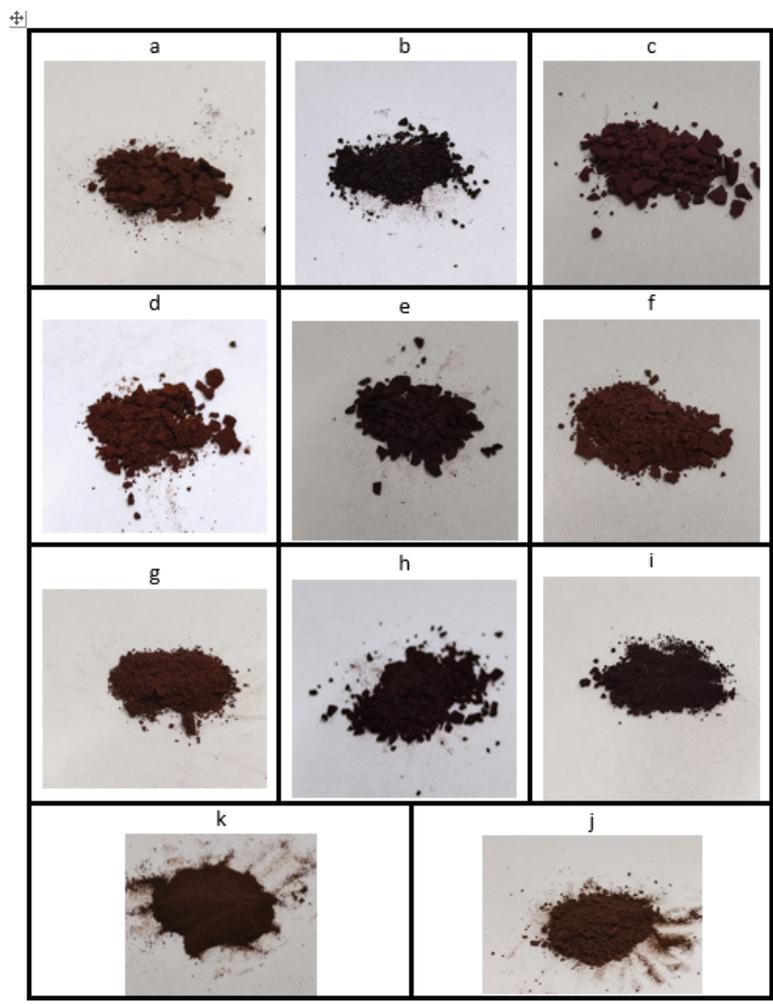


Figura 14. Ligninas aisladas de CMC. a) Klason variedad caramelo, b) Organosolv Pereira variedad caramelo, c) Organosolv Saha variedad caramelo, d) Klason variedad forastero, e) Organosolv Pereira variedad forastero, f) Organosolv Saha variedad forastero, g) klason variedad trinitario, h) Organosolv Pereira variedad trinitario, i) Organosolv Saha variedad trinitario, k) lignina kraft, j) lignina Klason de aserrín de pino

#### 4.4.2 Caracterización de las ligninas mediante FTIR

Todas las muestras de las ligninas aisladas se obtuvieron en estado sólido y totalmente insoluble en disolventes orgánicos o agua. Lo anterior justifica la selección de la espectroscopia IR, la cual es la técnica más utilizada en el análisis de grupos funcionales orgánicos principalmente. El análisis, sólo requirió una pequeña cantidad de muestra (10-15 mg) conservándose el carácter no destructivo, no invasivo y de alta sensibilidad de la técnica. Sin embargo, dada la

complejidad estructural de la matriz de análisis y la posible aparición de bandas asociadas a compuestos residuales no lignínicos, se usaron datos de la literatura; en los cuales se describen bandas características asociadas a las unidades constituyentes de la lignina como se muestra en el Cuadro 9.

Nuestro primer estudio corresponde a la determinación de espectros de FTIR junto con la reflectancia total atenuada (ATR), como herramienta la evaluación de las características estructurales de las ligninas aisladas por el método Klason de las distintas variedades (carmelo, trinitario y forastero) de CMC y como material comparativo lignina Kraft y de aserrín de madera de pino.

Cuadro 9. Absorción IR de los componentes típicos de la lignina

Longitud de onda/cm <sup>-1</sup>	Asignación	Grupos funcionales y estructuras en la lignina
3400–3600	Estiramiento O-H	Grupo hidroxilo libre
3100–3400	Estiramiento O-H	Grupo hidroxilo asociado
2820–2960	Estiramiento C–H	–CH <sub>2</sub> , –CH <sub>3</sub>
2920	Estiramiento O–H	Hidroxilo carboxílico
2650–2890	Estiramiento C–H	Grupo metilo en el metoxilo
1771	Estiramiento C=O	Carbonilo aromático
1700–1750	Estiramiento C=O	Cetonas, carbonilos y grupos ésteres no conjugados
1722	Estiramiento C=O	Carbonilo alifático
1650–1680	Estiramiento C=O	Carbonilo y Carboxilo conjugado <i>p</i> -sustituido
1500–1600	Vibración esquelética aromática	Anillo de benceno
1425, 1460	Deformación C–H	–CH <sub>2</sub> , –CH <sub>3</sub> y C-H del anillo de Benceno
1360–1370	Flexión C–H	–CH <sub>2</sub> , –CH <sub>3</sub>
1325–1330, 1230–1235	Estiramiento C–O	Anillo de siringilo
1270–1275	Estiramiento C-O y vibración C=C en el anillo aromático	Anillo de guayacilo
1215	Estiramiento C-O y C-C	Eter
1140	Estiramiento C–H	Guayacilo
1130	Estiramiento C–H	Siringilo
1088	Estiramiento C–O	Alcohol secundario y éter alifático
1030	Estiramiento C-O y C-C	Anillo aromático y alcohol primario
750–860	Estiramiento C–H	Anillo aromático

La Figura 14, muestra los distintos espectros determinados, en ellos se puede apreciar una tendencia muy marcada hacia ciertas bandas características de grupos funcionales correspondientes al biopolímero. Todas las ligninas extraídas de distintas variedades muestran una banda ancha entre  $3400-3260\text{ cm}^{-1}$  atribuida al estiramiento O-H, de los grupos hidroxilos tipo fenólico y/o, los de alcoholes libres R-OH, y estructuras alifáticas. La serie de bandas de baja intensidad que aparecen en la región  $2900\text{ y }2800\text{ cm}^{-1}$ , se asocian a estiramiento del C-H de los grupos metoxilos ( $-\text{OCH}_3$ ) del anillo aromático y de los grupos metil ( $\text{CH}_2$ ) y metileno (CH) de las cadenas laterales.

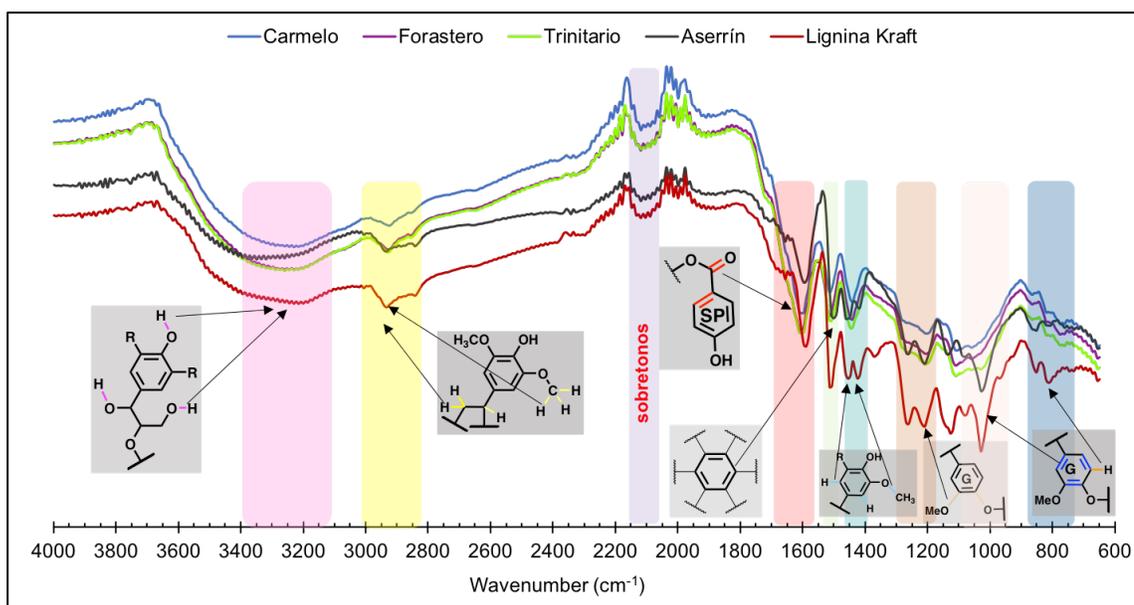


Figura 15. Espectros completos de IR de las ligninas aisladas de CMC de distintas variedades, lignina de aserrín de madera de pino por el método Klason y lignina Kraft

Una región muy importante también es la observada entre  $1700\text{ y }1680\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la región del grupo carbonilo/carboxilo. Las bandas de mediana intensidad que aparecen como un pequeño hombro en  $1680\text{ cm}^{-1}$ , pueden asociarse al estiramiento del enlace  $\text{C}=\text{O}$  del carbonilo conjugado ya sea con un doble enlace o en este caso un anillo aromático. En los modelos estructurales para lignina, estas señales aparecen en sistemas bastante

oxidados. En nuestro caso no se promovió algún proceso oxidativo, la otra posibilidad es la presencia de estructuras de carbonilos conjugado de esteres pertenecientes a la unidades de *p*-hidroxibenzoato de sinapilo (SP) (Figura 14). En la región de 1515-1520  $\text{cm}^{-1}$ , encontramos señales de notable intensidad asociada a las vibraciones del anillo aromático, esta señal no discrimina el tipo de unidad a la que pertenece el anillo aromático en la lignina. Igualmente, las vibraciones combinadas con deformaciones de los enlaces C-H del anillo aromático en la región de 1460  $\text{cm}^{-1}$ , son comunes para todas las ligninas y lo único discriminante es la intensidad de la señal. En esa misma región a 1420  $\text{cm}^{-1}$ , aparecen además de vibraciones esqueléticas del anillo aromático, vibraciones de flexión de O-CH<sub>3</sub> del metoxilo y vibración de CH<sub>2</sub>. Las regiones menores de 1400  $\text{cm}^{-1}$ , son las que presentan mayor dificultad para realizar una asignación, esto es debido a varios modos de vibración de los enlaces que se concentran en esta zona espectral. A pesar de ello, todas las muestras de lignina presentan estiramientos característicos para la unidad de Guayacol (G) en 1260  $\text{cm}^{-1}$ , en el caso de siringilo (S) debe notarse una señal intensa en la zona de 1300-1370  $\text{cm}^{-1}$ , en nuestros espectros no aparece una señal notable en esta zona, lo que indica mayor número de unidades de guayacilo que siringilo en este tipo de ligninas. La zona espectral en 1130  $\text{cm}^{-1}$  asocia a vibraciones complejas asociadas al C-O de unidades de siringilo y cerca de 1000  $\text{cm}^{-1}$  estiramientos similares C-O y C-C de anillo aromático y alcohol primario. Cerca de 820  $\text{cm}^{-1}$ , encontramos vibraciones C-H fuera del plano de los carbonos del anillo no sustituidos en las unidades de guayacol, sin una variación en la intensidad para cada tipo de variedad. Finalmente, en todas las variedades de lignina se observan sobretonos en la región de 2100  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 14).

Adicionalmente a esta caracterización, se hicieron análisis a las muestras de lignina obtenidas por otros métodos, como es el caso del metodo propuesto por Pereira (2017) y Saha (2019) (Figura 15 y 16). Este par de métodos de extracción de lignina son de tipo organosol. El analisis de los espectros de IR, muestra una características estructurales muy similares a las obtenidas por el metodo Klason (Figura 14).

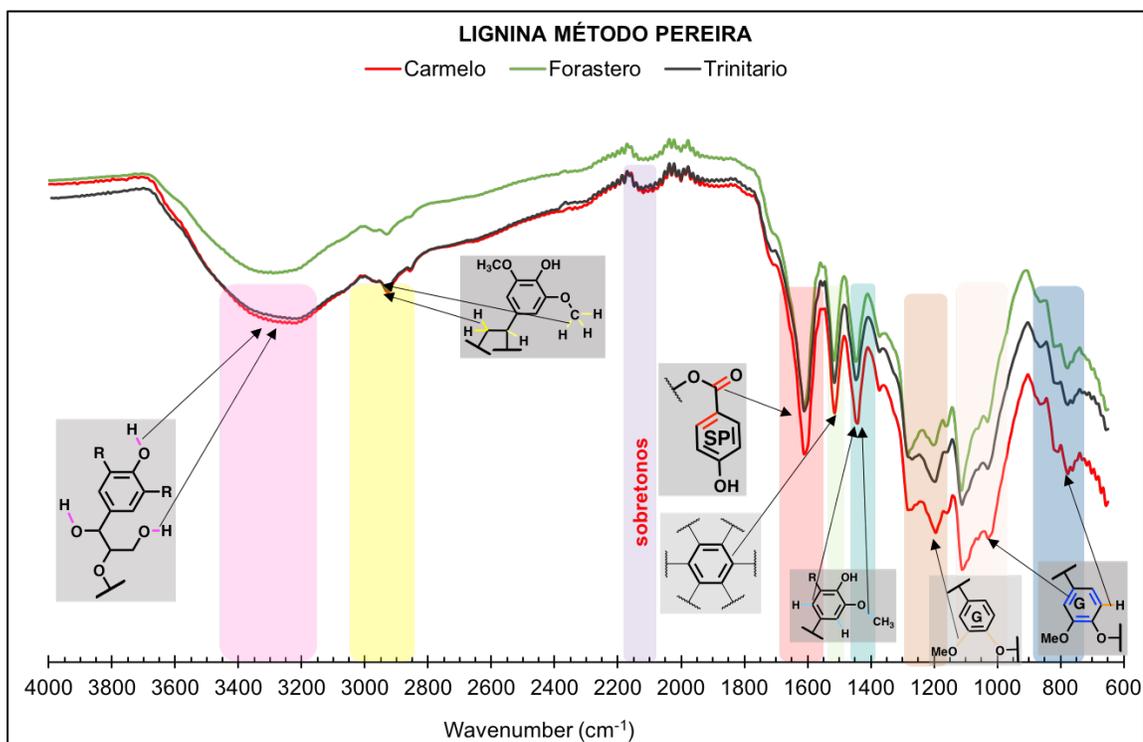


Figura 15 Espectro completos de IR de las ligninas aisladas de CMC de distintas variedades por el método propuesto por Pereira et al., 2017

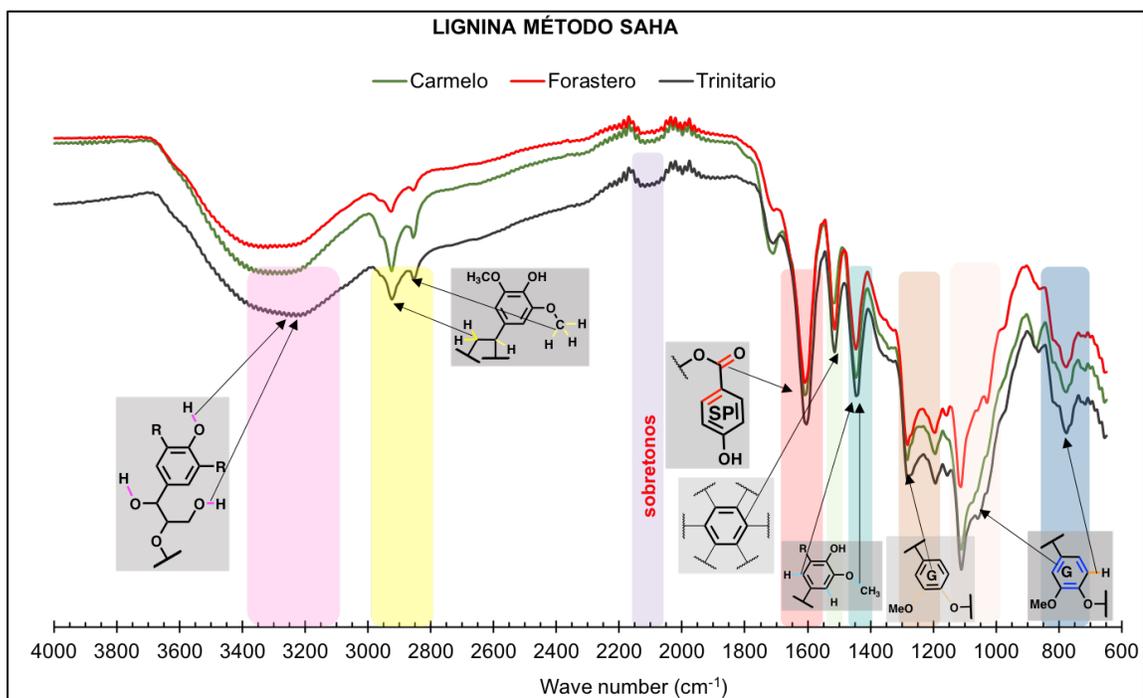


Figura 16. Espectro completos de IR de las ligninas aisladas de CMC de distintas variedades por el método propuesto por Saha et al., 2019

En los dos métodos organosolv, se observa pequeñas variaciones en intensidades, principalmente en las zonas de alta complejidad de señales, se puede observar en la región de  $1100\text{ cm}^{-1}$ , ensanchamiento de señales, esto se asocia a interacciones con residuos del disolvente orgánico (etanol, dioxano, etc), o con impurezas liberadas por dichos disolventes, como ácidos grasos. Sin embargo de manera general se observa una tendencia en el patrón de señales en IR, muy similar al de la lignina Klason.

En otro análisis se caracterizaron las ligninas asiladas de una variedad particular, por diferentes métodos (Saha, Pereira y Klason). Para la variedad Carmelo (Figura 17). se observa para el método Saha un incremento de intensidad en los estiramientos que aparecen en la región  $2900$  y  $2800\text{ cm}^{-1}$ . Es conocido, que usar dioxano proporciona lignina en buena cantidad y con mínimos cambios estructurales (Jahan & Mun, 2007). Sin embargo, hay evidencia que se pueden extraer pequeñas cantidades de carbohidratos del complejo lignina-carbohidrato en el material lignocelulósico (Gellerstedt et al. 1994)

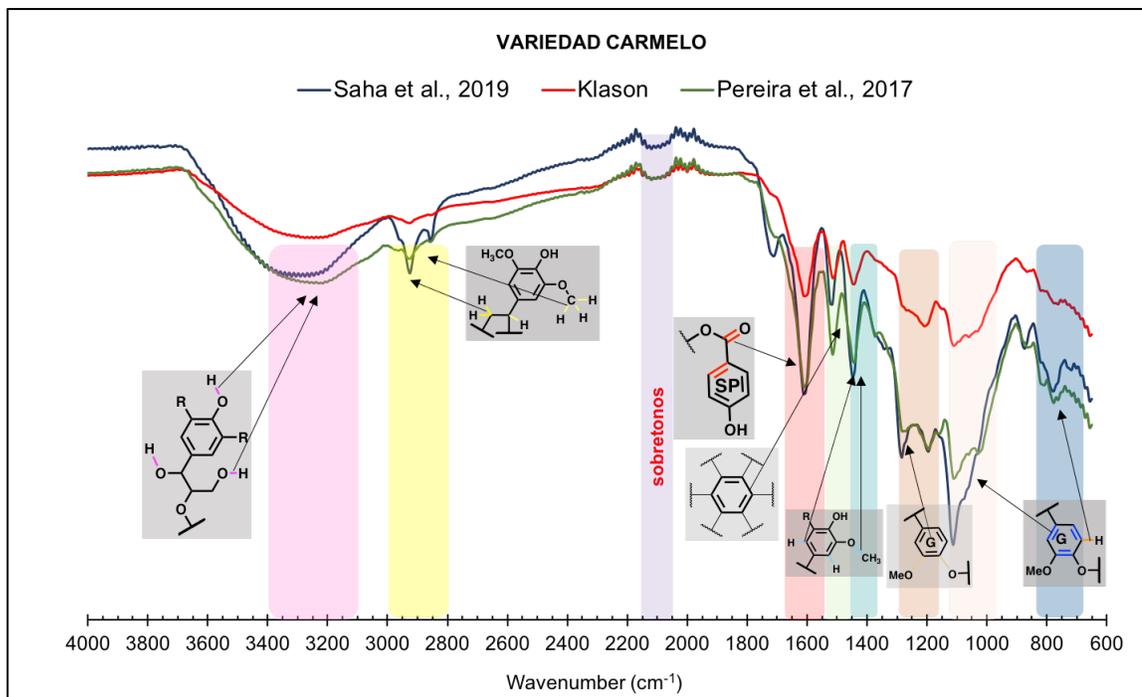


Figura 17. Espectros completos de IR de las ligninas aisladas de CMC por tres métodos de extracción de la variedad Carmelo

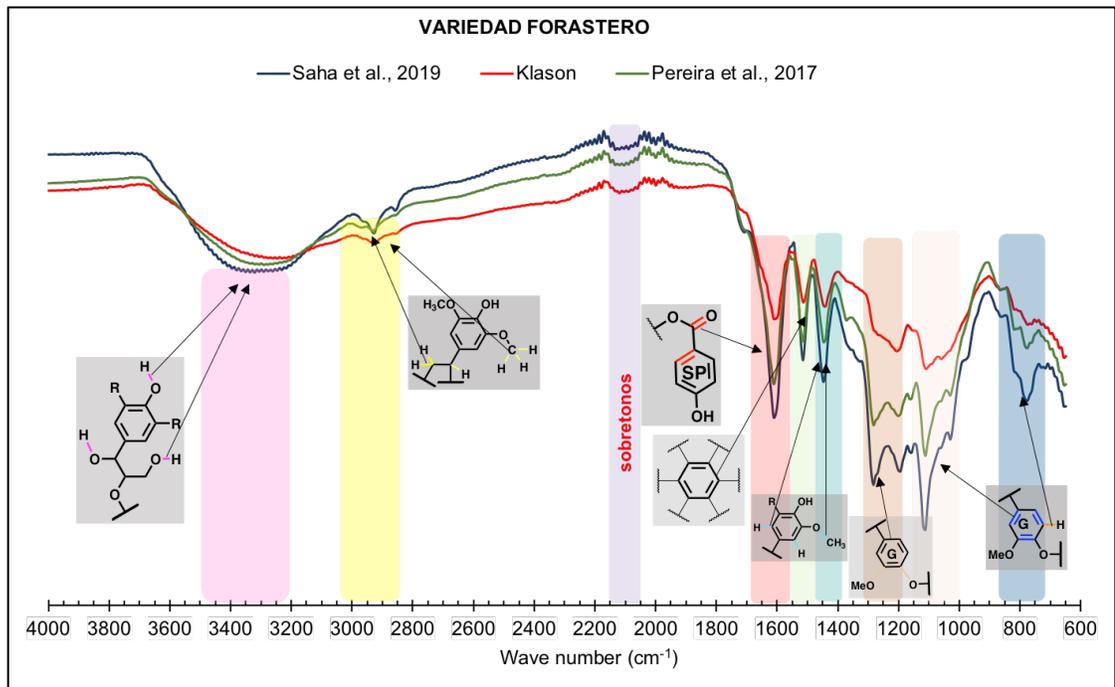


Figura 18. Espectros completos de IR de las ligninas aisladas de CMC por tres métodos de extracción de la variedad Forastero

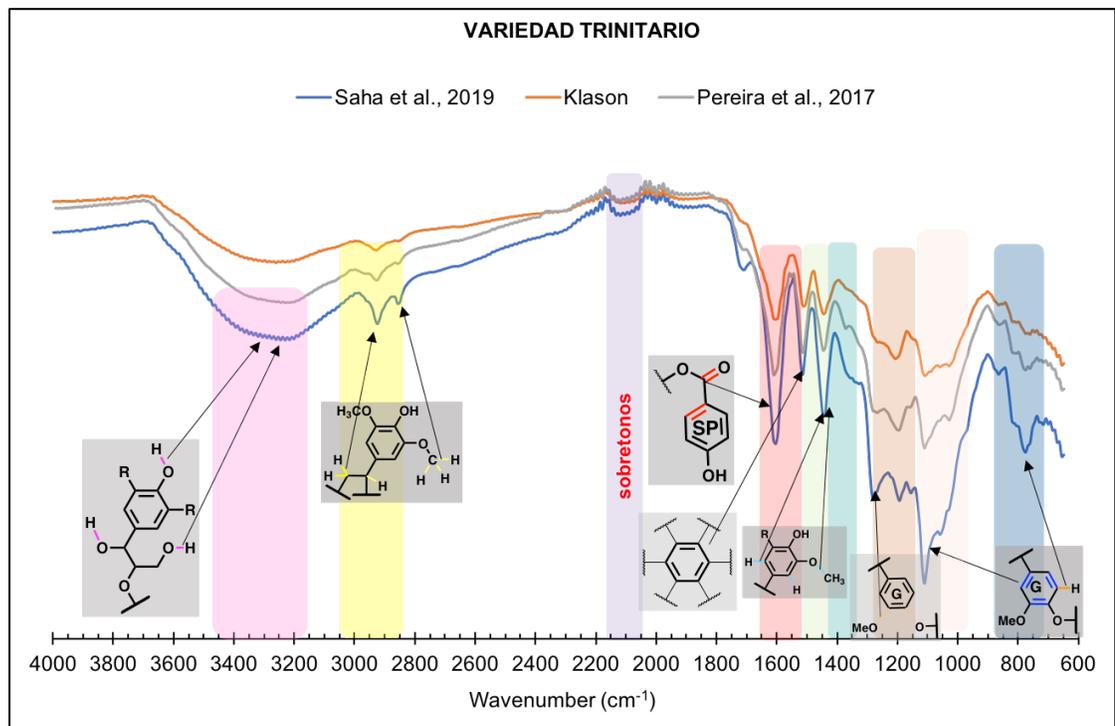


Figura 19. Espectros completos de IR de las ligninas aisladas de CMC por tres métodos de extracción de la variedad Trinitario

Las variaciones observadas confirma los efectos de disolvente (dioxano) en la estructura de la lignina, es probable que se incremente la movilidad estructural por los procesos de la despolimerización. Las señales en los espectros de IR (Figura. 17), muestran en  $1260\text{ cm}^{-1}$ , (unidades de Guayacil) típico en maderas duras. La no aparición de señales intensas en la zona de  $1700\text{ cm}^{-1}$ , evidencia ausencia de proceso de oxidación que son frecuentes en los métodos Organosolv. Estas variaciones fueron observadas de igual forma en los análisis de IR para la variedad forastero y trinitario (figuras 18 y 19).

#### 4.4.3 Caracterización de las ligninas klason acetiladas por FTIR

En un intento por funcionalizar la lignina tratando de volver la matriz mas soluble en disolventes orgánicos se acetiló la lignina. Se escogió la lignina tipo Klason de las 3 variedades y como blanco la lignina obtenida de aserrín del pino silvestre. La observación de los espectros, muestra de manera contundente el abatimiento de las señales en la región  $3400\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$  asociadas al estiramiento  $\text{-OH}$ .

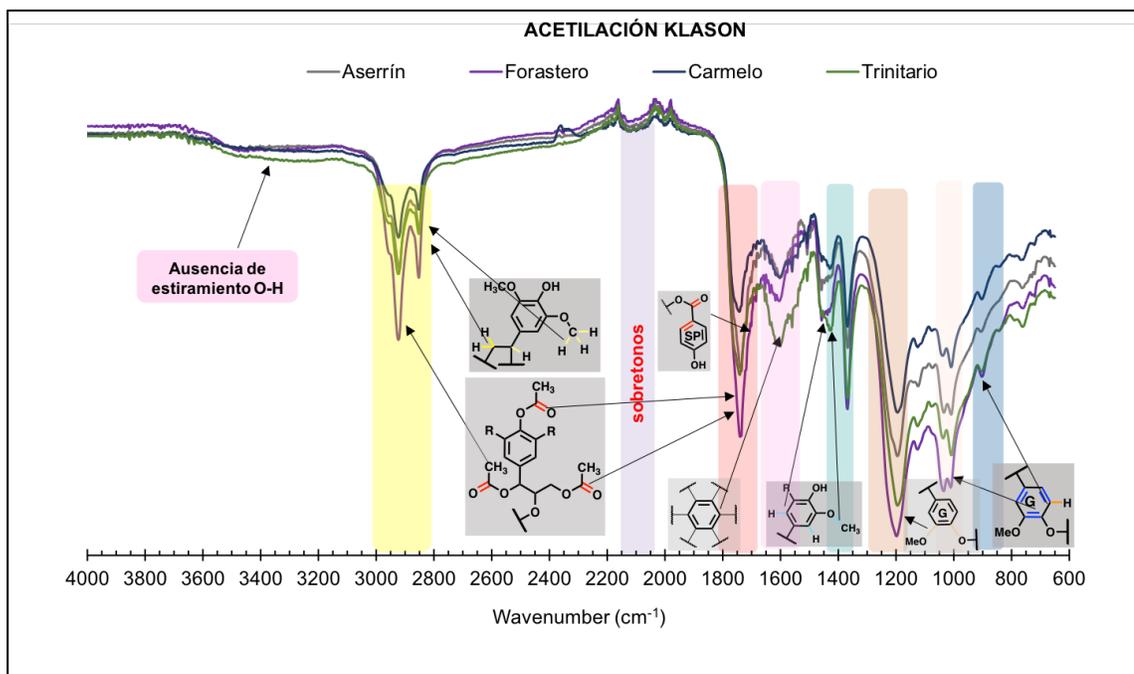


Figura 20. Espectros completos de IR de las ligninas Klason acetiladas aisladas de CMC de tres variedades y aserrín de madera de pino

La desaparición de estas señales va acompañada con el incremento en la intensidad de las señales en la zona de 2800 -3000  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 20). Por otro lado, se confirma la inclusión de los grupos acetilo en la estructura de la lignina (Faix, 1992)., es muy claro la aparición de las señales intensas en la región de 1700  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente al estiramiento C=O del grupo carbonilo en el acetato (figura 21)

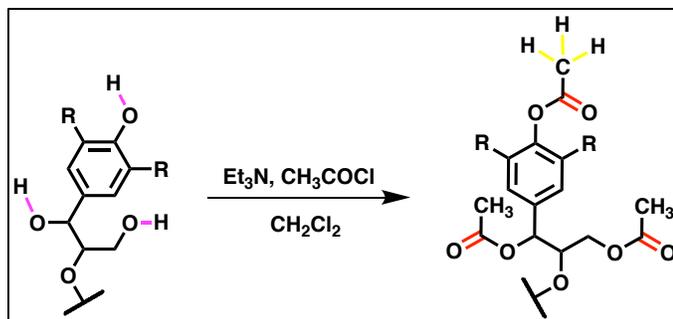


Figura 21. Reaccion de acetilación en las unidades estructurales de la lignina Klason de CMC.

A Las ligninas acetiladas en este estudio, se les hicieron pruebas de solubilidad en DMSO, Metanol, y  $\text{CHCl}_3$ , para obtener muestras con la intención de caracterizarlas por resonancia magnética nuclear. A pesar de demostrar por IR acetilaciones positivas, la recalcitrancia de la lignina no permitió la solubilidad en los disolventes citados.

#### 4.5 Conclusión

Se extrajo lignina de las distintas variedades de cascara de la vaina de cacao por tres métodos diferentes, obteniéndose un rendimiento similar por el método klason. Se reportan por primera vez rendimientos de extracción de lignina obtenida de la cáscara de la mazorca de cacao por los métodos organosolv propuestos por Pereira et al., 2017 y Saha et al., 2019. El análisis por IR de las ligninas aisladas por diferentes metodos y en diferentes variedades de CMC,

reveló características estructurales del biopolímero. Las principales estructuras detectadas y relacionadas de siringilo (S) y guayacilo (G), permiten establecer una tendencia en un contenido más observable de las unidades G, lo que de una manera general confirma el carácter del tipo de lignina de estas variedades como lignina tipo “Madera Dura”. Estos resultados mostraron homogeneidad en la estructura de la lignina en las diferentes variedades. Esto es importante en el trabajo de aprovechamiento y valorización de la lignina obtenida de las CPH para aplicaciones actuales o futuras.

#### 4.6 Literatura citada

- de Souza, L., Valladares, K., Amaro, G., Murawski, F., Vásquez, Z., Zwiercheczewski, P., . . . Soccol, R. (2022). Added-value biomolecules' production from cocoa pod husks: A review. *Bioresource Technology*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126252>
- Faix, O. (1992). Fourier Transform Infrared Spectroscopy. En S. Lin, & C. Dence, *Methods in Lignin Chemistry* (págs. 233-241). Berlin/Heidelberg: Springer. doi:[10.1007/978-3-642-74065-7\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-642-74065-7_16)
- Gellerstedt, G., & Henriksson, G. (2008). Lignins: Major Sources, Structure and Properties. En M. Naceur, & A. Gandini, *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources* (págs. 201-224). Elsevier. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045316-3.00009-0>
- Glasser, W., & Sarkanen, S. (1989). Lignin, properties and materials. Washington: ACS Symposium Series American Chemical Society. doi:[10.1021/bk-1989-0397](https://doi.org/10.1021/bk-1989-0397)
- Halpin, C. (2004). Investigating and Manipulating Lignin Biosynthesis in the Postgenomic Era. *Advances in Botanical Research*, 63-106. doi:[https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(04\)41002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(04)41002-7)
- Haque, A., Remadevi, R., & Naebe, M. (2018). Lemongrass (*Cymbopogon*): a review on its structure, properties, applications and recent developments. *Cellulose*, 5455-5477. doi:<https://doi.org/10.1007/s10570-018-1965-2>
- Haque, A., Remadevi, R., & Naebe, M. (2021). A review on cotton gin trash: Sustainable commodity for material fabrication. *Journal of Cleaner Production*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125300>

- Holtman, K., Chen, N., Chappell, M., Kadla, J., Xu, L., & Mao, J. (2010). Chemical Structure and Heterogeneity Differences of Two Lignins From Loblolly Pine As Investigated by Advanced Solid-State NMR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 9882-9892. doi:10.1021/jf101258x
- ICCO. (31 de Agosto de 2022). International Cocoa Organization . Obtenido de Statistics: [https://www.icco.org/wp-content/uploads/Production\\_QBCS-XLVIII-No.-3.pdf](https://www.icco.org/wp-content/uploads/Production_QBCS-XLVIII-No.-3.pdf)
- Jahan, M. S., & Mun, S. P. (2007). Characteristics of dioxane lignins isolated at different ages of nalita wood (*trema orientalis*). *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 27(2), 83–98. <https://doi.org/10.1080/02773810701486865>
- Lee, H., Hamid, S., & Zain, K. (2014). Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. *The Scientific World Journal*, 1-20. doi: <https://doi.org/10.1155/2014/631013>
- Lu, F., Rodriguez, J., Van Damme, I., Westwood, N., Shaw, L., Robinson, J., . . . Charalampopoulos, D. (2018). Valorisation strategies for cocoa pod husk and its. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 80-88. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.07.007>
- Lu, Y., Lu, Y., Hu, Q., Xie, F., Wei, X., Fan, & X. (2017). Structural Characterization of Lignin and Its Degradation Products with Spectroscopic Methods. *Journal of Spectroscopy*, 1-15. doi:<https://doi.org/10.1155/2017/8951658>
- Pehrsson, H. (1949). The solvent extraction of lignin with dioxane. Masters thesis. Oregon State College, USA.
- Pepper, J., Baylis, P. & Adler, E. (1959). The isolation and properties of lignins obtained by the acidolysis of spruce and aspen woods in dioxane–water medium. *Canadian Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1139/v59-183>
- Pereira, M., Henrique, P., Gomes, D., Botelho, J., Silveira, J. & Manuretto, M. (2017). Extraction of Organosilv Lignin from Rice Husk under Reflux Conditions. *Biological and Chemical Research*, 87-98.
- Saha, M., Bernstein, P., Borah, A., Malani, R., Arya, S. & Moholkar, V. (2019). Dioxane-based extraction process for production of high quality lignin. *Bioresource Technology Reports*, 206-211. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.01.018>
- Sasaki, C., Wanaka, M., Takagi, H., Tamura, S., Asada, C. & Nakamura, Y. (2013). Evaluation of epoxy resins synthesized from steam-exploded bamboo lignin. *Industrial Crops and Products*, 757-761. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.018>
- TAPPI. (1997). Preparation of Wood for chemical análisis T 264 CM-97.

- TAPPI. (1997). Solvent extractives of wood and pulp T 204 cm-97.
- TAPPI. (2002). Acid-insoluble lignin in wood and pulp T 222 om-02.
- Vásques, Z., de Carvalho, P., Pereira, G., Vandenberghe, L., de Oliveira, P., Tiburcio, P., . . . Soccol, C. (2019). Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Management*, 72-83. doi:<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.04.030>
- Vriesmann, L., De Mello, R., & de Oliveira, C. (2011). Cacao Pod Husks (*Theobroma cacao* L.): Composition and hot-water-soluble pectins. *Industrial Crops and Products*, 1173-1181. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.04.004>
- Vriesmann, L., Teófilo, R., & Petkowics, C. (2011). Optimization of nitric acid-mediated extraction of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) using surface methology. *Carbohydrate Polymers*, 1230-1236. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.018>
- Welker, C., Balasubramanian, V., Petti, C., Rai, K., DeBolt, S., & Mendu, V. (2015). Engineering Plant Biomass Lignin Content and Composition for Biofuels and Bioproducts. *Energies*, 7654-7676. doi:10.3390/en8087654
- Witcraft, G. (1949). The Dioxane Extraction of Lignin From Wood. Masters thesis. Oregon State College, USA.
- Yapo, B., Besson, V., Koubala, B., & Koffi, K. (2013). Adding Value to Cacao Pod Husks as a Potential Antioxidant-Dietary Fiber Source. *American Journal of Food and Nutrition*, 38-46. doi:10.12691/ajfn-1-3-4
- Zhang, Y. & Naebe, M. (2021). Lignin: A Review on Structure, Properties, and Applications as a Light-Colored UV Absorber. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 1427-1442. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c06998>