



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

**DESARROLLO Y APLICACIÓN DE METODOLOGÍAS VERDES PARA
PRETRATAMIENTO DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA DE CÁSCARA DE
CACAO**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

Presenta:

Q.A. MARÍA GUADALUPE VILLAFUERTE SALAZAR



Bajo la supervisión de: DR. HOLBER ZULETA PRADA



Chapingo, Estado de México, noviembre de 2023

**DESARROLLO Y APLICACION DE METODOLOGIAS VERDES PARA
PRETRATAMIENTO DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA DE CÁSCARA DE
CACAO**

Tesis de la **Q.A. MARÍA GUADALUPE VILLAFUERTE SALAZAR** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

DIRECTOR:



DR. HOLBER ZULETA PRADA

CO-DIRECTOR:



DR. BENITO REYES TREJO

ASESOR:



DR. JOSÉ ENRIQUE HERBERT PUCHETA

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	V
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
DEDICATORIAS	IX
AGRADECIMIENTOS	X
DATOS BIOGRÁFICOS	XI
RESUMEN GENERAL	XII
GENERAL ABSTRAC	XIII
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	14
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA	18
2.1 BIOMASA	18
2.2 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA	19
2.2.1 Composición química	19
2.2.2 Celulosa	21
2.2.3 Hemicelulosa	22
2.2.4 Lignina	23
2.3 CÁSCARA DE CACAO	24
2.3.1 Composición química de la CMC	24
2.3.2 Usos y aprovechamiento de la CMC como fuente de material lignocelulósico	25
2.4 PRETRATAMIENTOS PARA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA	26
2.4.1 Pretratamientos químicos	28
2.4.2 Pretratamientos físicos	29
2.4.3 Pretratamientos biológicos	30
2.4.4 Pretratamientos combinados	31
2.5 METODOLOGÍAS VERDES (QUÍMICA VERDE)	31
2.6 LÍQUIDOS IÓNICOS Y SUS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS	33
2.6.1 Uso potencial de los líquidos iónicos en el pretratamiento de biomasa lignocelulósica	35
2.7 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA PRETRATADA CON LI	36

2.7.1. Caracterización de compuestos orgánicos por FT-IR de biomasa pretratada	37
2.7.2. Caracterización estructural (morfológica) por microscopia electrónica de barrido (SEM) de biomasa pretratada	38
2.7 LITERATURA CITADA.....	40
3. DESARROLLO Y APLICACIÓN DE METODOLOGÍAS VERDES PARA PRETRATAMIENTO DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA DE CÁSCARA DE CACAO.	52
3.1 INTRODUCCIÓN.....	52
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	53
3.2.1 Material vegetal	53
3.2.2 Equipos y reactivos	54
3.2.3 Caracterización del material vegetal: Determinación de extraíbles ...	55
3.2.4 Caracterización del material lignocelulósico: Cuantificación de lignina insoluble en ácido (Lignina Klason)	55
3.2.5 Cuantificación de Holocelulosa	56
3.2.6 Cuantificación de Celulosa	57
3.2.7 Cuantificación de cenizas.....	57
3.2.8 Pretratamientos con líquidos iónicos asistido en microondas	58
3.2.9 Caracterización estructural por FTIR-ATR	59
3.2.10 Caracterización estructural por microscopia electrónica de barrido (SEM)	59
3.2.11 Análisis estadístico	59
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
3.3.1 Cuantificación de extraíbles y material lignocelulósico de la cáscara de cacao.....	60
3.3.2 Análisis de líquido iónico remanente y de sólidos totales recuperados en los pretratamientos.	62
3.3.3 evaluación del Efecto de los pretratamientos en la estructura de la biomasa: Caracterización estructural por FT-IR	68
3.3.2.3 Efecto de los pretratamientos en la micro-estructura de la biomasa: Análisis por microscopia electrónica de barrido (SEM)	73
3.4 CONCLUSIONES.....	77
3.5 LITERATURA CITADA.....	79
ANEXO 1. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	83

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.Composición de diversas fuentes de biomasa lignocelulósica	21
Cuadro 2. Composición química de la cáscara de cacao (g.100 g-1 materia seca).	25
Cuadro 3.Pretratamientos químicos y su efecto en la biomasa lignocelulósica	29
Cuadro 4.Principales bandas espectrales de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para grupos funcionales de BLC	37
Cuadro 5. Diseño experimental de los pretratamientos aplicados	58
Cuadro 6. Cuantificación del material lignocelulósico de tres tamaños de partícula de la cáscara de cacao, variedad Carmelo.	61
Cuadro 7. Composición química (material lignocelulósico) de cáscara de cacao, reportada en trabajos previos	62
Cuadro 8. Absorción IR características en el estudio de la BLC (adaptado de Xu & Wang, 2015)	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procesos para convertir biomasa en energía y productos de interés	18
Figura 2. Componentes de la BLC (Fuente: García-Fernández, 2022).	20
Figura 3. Subunidades de la celulosa (Adaptado de Dergal, 2006)	22
Figura 4. Cacao (fruto completo)	24
Figura 5. Métodos más empleados en el pretratamiento de biomasa lignocelulósica (Fuentes: Hassan et al., 2018; Singh et al., 2018; Tu y Hallett, 2019)	28
Figura 6. Los 12 principios de la Química verde	32
Figura 7. Principales cationes y aniones usados en la síntesis de líquidos iónicos	34
Figura 8. Imágenes SEM de paja de arroz: a) Sin pretratamiento; b)-d) pretratadas con dos líquidos iónicos a diferentes tiempos y temperaturas de reacción. (Fuente: Poy et al., 2023)	39
Figura 9. Obtención y preparación de muestras para su análisis.	54
Figura 10. Metodología para la determinación de extraíbles en CPH, de acuerdo a la Norma T-204cm-97	55
Figura 11. a) Espectro ^1H -RMN de $\text{BMIM}[\text{BF}_4]$ Puro, b) ^1H -RMN de líquido recuperado de pretratamiento a 100°C , c) ^1H -RMN de líquido recuperado de pretratamiento a 150°C , d) ^1H -RMN de líquido recuperado de pretratamiento a 180°C	64
Figura 12. Porcentajes de recuperación de sólidos después de los diferentes pretratamientos con $[\text{BMIM}]\text{BF}_4$	65
Figura 13. Interacciones donador-aceptor de electrones (EDA) entre grupos alquilimidazolio e iones hidrogen-sulfato con los grupos hidroxilo de la celulosa/hemicelulosa (Fuente: Nis & Kaya, 2021; Matsagar & Dhepe, 2015) .	66
Figura 14. Porcentajes de recuperación de sólidos después de los diferentes	

pretratamientos con [HMIM]Cl	67
Figura 15. Espectros de IR de los sólidos recuperados en pretratamientos con [BMIM]BF ₄ y [HMIM]Cl, a diferentes tiempos y temperaturas para CMC malla 45.	70
Figura 16. Espectros de IR de los sólidos recuperados en pretratamientos con [BMIM]BF ₄ y [HMIM]Cl, a diferentes tiempos y temperaturas para CMC malla 60.	72
Figura 17. Espectros de IR de los sólidos recuperados en pretratamientos con [BMIM]BF ₄ y [HMIM]Cl, a diferentes tiempos y temperaturas para CMC malla 80.	73
Figura 18. Micrografías SEM de pretratamientos con líquidos iónicos de CMC a 100°C (b y c) y a 150°C (d y e)	74
Figura 19. Micrografías SEM de pretratamientos con líquidos iónicos de CMC a 180°C (b y c) y a 200°C (d y e).	76

LISTA DE ABREVIATURAS

BLC	Biomasa lignocelulósica
CMC	Cáscara de mazorca de cacao
LI's	Líquidos iónicos
[BMIM]BF₄	Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio
[HMIM]Cl	Cloruro de 1-Hexyl- 3-metilimidazolio
SEM	Scanning Electron Microscope
IR	Infrarrojo
mL	Mililitros
µm	Micrómetro o micra
MeOH	Metanol
EtOH	Etanol
CH₂Cl₂	Diclorometano
¹H RMN	Resonancia Magnética nuclear de protón
FT-IR	Fourier Transform Infra Red
FF	Furfural
5HMF	5-hidroximetilfurfural
AL	Ácido levulínico
FA	Ácido fórmico
NaOH	Hidróxido de sodio

DEDICATORIAS

A mi Familia: Ignacio, Tere, Carlos, Lau, Ale, Bett, Ana, Daniel, Cami, Emir, Rahmsi, Emi, por todo su amor y su apoyo, por ser día con día mi fuente de inspiración, mi alegría y mi mayor motor.

A Dios por ser mi fuente de fortaleza, apoyo y sabiduría a lo largo de mi vida.

A ti Joan, que te has convertido en un motor más en mi vida, una gran fuente inspiración, por el amor y el apoyo que me has brindado en este tiempo.

A mis amigos: Amai, Angie, Bren, Erik, Eva, Fer, Iris, Mag, MariHelen, Mel, Noem, Rebe, Reina, Zel, quiénes siempre me han alentado a seguir adelante, me han brindado una bonita y sincera amistad a pesar de la distancia.

A los compañeros del Laboratorio de investigación en Productos Naturales: Armando, Atenea, Benjamín, Carlos, Edna, Haziél, Hypatia, Jhusua, Josúe, Néstor, Pamela, Paola, Sebastián, Ulises y Wendy por el apoyo técnico, el tiempo compartido, por los aprendizajes y gratos momentos.

AGRADECIMIENTOS

A quienes me brindaron su apoyo en algún momento y que hicieron posible concluir este proyecto, gracias.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico brindado (con CVU: 1144762) durante la realización de este proyecto

A la Universidad Autónoma Chapingo y en especial al Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria por brindarme la oportunidad, la infraestructura, las herramientas y conocimientos necesarios para seguirme formando profesionalmente.

A todos los profesores que me alentaron y contribuyeron con conocimientos para mi formación académica y profesional durante la realización de la maestría.

A los doctores que formaron parte de mi comité asesor: Dr. Benito Reyes Trejo, Dr. Holber Zuleta Prada y Dr. José Enrique Herbert Pucheta, por tomarse el tiempo de orientarme y capacitarme durante el desarrollo y conclusión de este proyecto.

A todos mis compañeros de MCyTA Generación 20, por su apoyo y el tiempo compartido, pero especialmente a Dianita y Jenn con quienes inicio este proyecto y compartí gratos momentos y aprendizajes.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos Personales

Nombre: María Guadalupe Villafuerte Salazar

Fecha de nacimiento: 07 de octubre de 1993

Lugar de nacimiento: Los Reyes la Paz, Estado de México

CURP: VISG931007MMCLLD04

Profesión: Química de Alimentos

Cédula Profesional: 12282992



Desarrollo Académico

Bachillerato: Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel Sur

Licenciatura: Facultad de Química, UNAM

RESUMEN GENERAL

DESARROLLO Y APLICACIÓN DE METODOLOGÍAS VERDES PARA PRETRATAMIENTO DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA DE CÁSCARA DE CACAO.

En este trabajo se utilizaron cáscaras de la mazorca de cacao (CMC); las cuales son el principal subproducto poco aprovechado en la industria del chocolate. Primeramente, este residuo de biomasa lignocelulósica (BLC) se caracterizó mediante la determinación de su composición química (extraíbles, lignina, celulosa, hemicelulosa y cenizas). Adicionalmente, se estudió la aplicación de pretratamientos que involucran calentamientos asistidos por microondas sobre una mezcla de material lignocelulósico con líquidos iónicos. Posteriormente, se evaluó la obtención y liberación de los principales biopolímeros (celulosa, hemicelulosa y lignina) del material lignocelulósico de CMC. Se realizó un ANOVA empleando un diseño factorial 3^k considerando factores como la temperatura (100,150,180 y 200°C), los tiempos de reacción (5,10 y 15 min) y el tamaño de partícula empleados (355, 250 y 180 μm), las variables respuesta seleccionadas fueron el porcentaje de recuperación de sólidos en cada tratamiento. Además, se evaluó de manera cualitativa los cambios estructurales mediante espectroscopia infrarroja (IR) y mediante Microscopía electrónica de barrido (SEM) entre las distintas muestras pretratadas. El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre pretratamientos aplicados, presentando un mayor porcentaje de recuperación de sólidos en el pretratamiento con mayor tamaño de partícula (355 μm), menores temperaturas (100°C, 150°C) y menores tiempos de reacción (5 y 10 min). El análisis por IR reveló en la región 3400 cm^{-1} una contracción en la intensidad de las señales, en el pretratamiento térmico con BMIM, lo que indica una interacción de este líquido iónico con los enlaces O-H de los biopolímeros componentes del BLC. Las micrografías del material lignocelulósico (CMC), muestran cambios en la morfología de la superficie antes y después de los pretratamientos con ambos líquidos iónicos, prevaleciendo la irregularidad y la porosidad como observaciones principales; lo que indica destrucción parcial del material lignocelulósico.

Palabras clave: biomasa lignocelulósica, cáscara de cacao, pretratamientos, metodologías verdes, líquidos iónicos.

Tesis de Maestría en Ciencia, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: María Guadalupe Villafuerte Salazar

Director de Tesis: Dr. Holber Zuleta Prada

GENERAL ABSTRACT

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF GREEN METHODOLOGIES FOR PRETREATMENT OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS FROM COCOA POD HUSK.

In this work, cocoa pod husks (CPH) were used, which are the main underutilized byproduct in the chocolate industry. Firstly, this lignocellulosic biomass residue (LCB) was characterized by determining its chemical composition (extractives, lignin, cellulose, hemicellulose, and ash). Additionally, the application of pretreatments involving microwave-assisted heating on a mixture of lignocellulosic material with ionic liquids was studied. These pretreatments aim to break down the complex composition of LCB in order to enhance the efficient and environmentally friendly production of value-added products. Subsequently, the extraction and release of the main biopolymers (cellulose, hemicellulose, and lignin) from the lignocellulosic material of CPH were evaluated. An analysis of variance was performed using a 3k factorial design, considering factors such as temperature (100, 150, 180, and 200°C), reaction times (5, 10, and 15 min), and particle sizes (355, 250, and 180 µm). The selected response variables were the percentage of solid recovery in each treatment. Additionally, qualitative changes in structure were evaluated using infrared spectroscopy (IR) and scanning electron microscopy (SEM) among the different pretreated samples. The analysis of variance showed significant differences between the applied pretreatments, with a higher percentage of solid recovery in the pretreatment with larger particle size (355 µm), lower temperatures (100°C, 150°C), and shorter reaction times (5 and 10 min). The IR analysis revealed a decrease in signal intensity in the 3400 cm⁻¹ regions in the thermal pretreatment with BMIM, indicating an interaction of this ionic liquid with the O-H bonds of the biopolymers composing the LCB. Micrographs of the lignocellulosic material (CMC) showed changes in surface morphology before and after pretreatments with both ionic liquids, with irregularity and porosity prevailing as the main observations, indicating partial destruction of the lignocellulosic material.

Key words: lignocellulosic biomass, cocoa pod husk, pretreatments, green methodologies, ionic liquids

Thesis of Master Science. Program of Agro-Food Science and Technology, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: María Guadalupe Villafuerte Salazar

Advisor: Dr. Holber Zuleta Prada

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En la actualidad, hay una creciente preocupación por la escasez de combustibles fósiles y los efectos negativos que su uso tiene en el medio ambiente. Esto ha despertado el interés científico en el desarrollo de sistemas de energía sostenible basados en el uso de biomasa lignocelulósica renovable (Liu & Yu, 2021). En este enfoque, la biomasa lignocelulósica (BLC) se presenta como una excelente opción, ya que es un material abundante y renovable derivado de plantas y residuos agroindustriales (Hernández-Mendoza et al., 2021). Estos materiales son una fuente sostenible para la producción económica de biocombustibles, productos químicos y biomateriales. La biomasa lignocelulósica tiene una composición compleja, compuesta principalmente por celulosa (30-60%), hemicelulosa (14-40%) y lignina (7-25%), junto con otros compuestos orgánicos e inorgánicos en cantidades mínimas (Okolie et al., 2021; Bhatia et al., 2019; Dahadha et al., 2017; Putro et al., 2016; Yu et al., 2017). La complejidad de esta matriz de biopolímeros está determinada principalmente por las microfibrillas de celulosa, que forman una estructura cristalina compuesta por múltiples hebras y moléculas de azúcar. Estas microfibrillas están envueltas en hemicelulosas y lignina, que protegen la celulosa de ataques microbianos. El desafío clave para aprovechar estos materiales poliméricos y obtener productos de interés, como biocombustibles, biomateriales, fertilizantes y moléculas base, radica en desenredar las complejas estructuras poliméricas. Por lo tanto, es necesario aplicar pretratamientos que faciliten el acceso a los biopolímeros y sus subunidades, con el fin de lograr un aprovechamiento más eficiente de la BLC. Los estudios realizados en diversas fuentes de biomasa han demostrado que durante estos procesos, la lignina se elimina eventualmente, mientras que la hemicelulosa puede ser destruida o conservada y el grado de cristalinidad en la celulosa disminuye considerablemente, lo que resulta en un aumento en la porosidad del material (Usmani et al., 2020) y una mayor eficiencia de bioconversión después de los pretratamientos. Se han investigado y aplicado

numerosos métodos de pretratamiento para materiales lignocelulósicos, incluyendo métodos físicos, químicos, biológicos y combinaciones de los mismos (Zhao et al., 2023), principalmente en el mejoramiento de procesos en la obtención de biocombustibles. Actualmente, las técnicas de pretratamiento químico, termoquímico y la combinación de otros métodos son considerados los procesos más eficientes y prometedores desde un punto de vista económico y comercial. Desde la perspectiva de la investigación prioritaria, un enfoque que está recibiendo mucha atención es el estudio de modelos de pretratamiento altamente eficientes que sean aplicables a la mayoría de las fuentes de biomasa lignocelulósica, sean respetuosos con el medio ambiente y tengan costos reducidos. Uno de los pretratamientos que ha despertado interés científico en diversas aplicaciones es el uso de líquidos iónicos (LI's). En los últimos años, se han utilizado en procesos de extracción, reacciones químicas, procesos electroquímicos, entre otros. Estos líquidos iónicos se consideran disolventes eficientes y "verdes" para la celulosa y otros materiales, ya que no generan gases tóxicos o explosivos. Los líquidos iónicos son sales compuestas típicamente por grandes cationes orgánicos y pequeños aniones inorgánicos, que existen en estado líquido a temperatura ambiente (Roy & Chundawat, 2022). Otro aspecto a destacar, que hace que los pretratamientos sean costosos y no amigables con el medio ambiente, es el calentamiento; sin embargo, este inconveniente se puede resolver mediante el uso de radiación de microondas, que se caracteriza por una mayor eficiencia energética en comparación con el calentamiento convencional. Las ventajas del uso de microondas también incluyen la posibilidad de detener el calentamiento de manera inmediata, el calentamiento directo de todo el volumen de la biomasa en lugar de a través de las paredes del recipiente. Los calentamientos se han visto favorecidos cuando se utilizan en combinación con diversas disoluciones como ácidos orgánicos o inorgánicos diluidos, álcalis, líquidos iónicos, disolventes eutécticos profundos, disolventes orgánicos o amoníaco. Estos procesos de calentamiento asistidos por radiación de microondas para el pretratamiento de residuos se han utilizado en varias

aplicaciones, aumentando la disposición de la biomasa a la hidrólisis enzimática y fermentación (Mikulski & Kłosowski, 2023).

Entre las fuentes de biomasa lignocelulósica más estudiadas para la obtención de biocombustibles y otras moléculas de alto valor agregado, se encuentran, el bagazo de agave, el bagazo de caña de azúcar, la paja de arroz y de trigo. Sin embargo, aún existen diversas fuentes de material lignocelulósico a considerar para su potencial aprovechamiento, entre ellas se encuentra la cáscara de la mazorca de cacao (CMC) o cocoa pod husk (CPH), por sus siglas en inglés, la cual, de acuerdo con su composición química, es una fuente rica en material lignocelulósico (Valladares-Diestra et al., 2022). La CMC es el principal subproducto que se genera después de la eliminación de las semillas y representa el 70-75% del peso de la fruta fresca de cacao (Outtara et al., 2021; Lu, et al., 2018; Pérez et al., 2015). Se estima que, por cada tonelada de semillas obtenidas, se generan 10 toneladas de CMC (base húmeda), de las cuales solo un bajo porcentaje se aprovecha y el resto se desecha, causando problemas económicos, ambientales y sociales. En México, se estima una producción anual de 28 mil toneladas, siendo Tabasco uno de los principales estados productores con un aporte de 18.297 toneladas anuales, por lo cual es de suma importancia desarrollar metodologías que permitan el aprovechamiento de este recurso fuente importante de material lignocelulósico. De acuerdo con lo anterior, en este estudio se planteó el uso de la cáscara de mazorca de cacao como insumo de material lignocelulósico, con el objetivo de desarrollar y/o aplicar pretratamientos enmarcados en metodologías verdes (amigables con el ambiente) para obtener materiales aptos que permitan su posterior bioconversión en otros productos de valor agregado. Para ello, el presente estudio se dividió en tres fases: la primera fase consistió en la selección, recolección y preparación de muestras del material lignocelulósico (cáscaras de mazorca de cacao), seguido por la caracterización química de las muestras de acuerdo con las normas TAPPI. La segunda y más relevante fase consistió en la aplicación de un pretratamiento mediante el uso de dos líquidos iónicos en calentamientos asistidos por microondas. La tercera etapa

consistió en el análisis de la biomasa obtenida luego del pretratamiento, cuantificando el porcentaje de recuperación de sólidos totales y de líquido iónico, además del análisis estructural mediante técnicas como FTIR y SEM. Es posible que el uso de estos pretratamientos combinados LI's-calentamiento con microondas tenga un efecto de desintegración en la BLC de CMC. Este estudio es importante, ya que, además del interés científico, es posible generar nuevas oportunidades de ingresos y empleo para las personas en áreas rurales involucradas con el cultivo del cacao y la industria del chocolate.

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 Biomasa

Se considera como biomasa a toda aquella fracción de materia orgánica proveniente de residuos agrícolas, forestales, aguas residuales, residuos sólidos urbanos (FORSU) y de otras industrias, principalmente las agroalimentarias, la cual puede ser empleada como fuente de energía (Mehedintu et al., 2018; Vaithyanathan et al., 2023). Dado su origen, abundancia y composición, en los últimos años se han realizado estudios que proponen el uso de la biomasa como una fuente de energía limpia, ya que a diferencia de los combustibles fósiles ésta presenta bajas emisiones de gases de efecto invernadero, lo que ayudaría a contrarrestar el impacto ambiental que provocan las fuentes de energía tradicionales (Kothari et al., 2022).

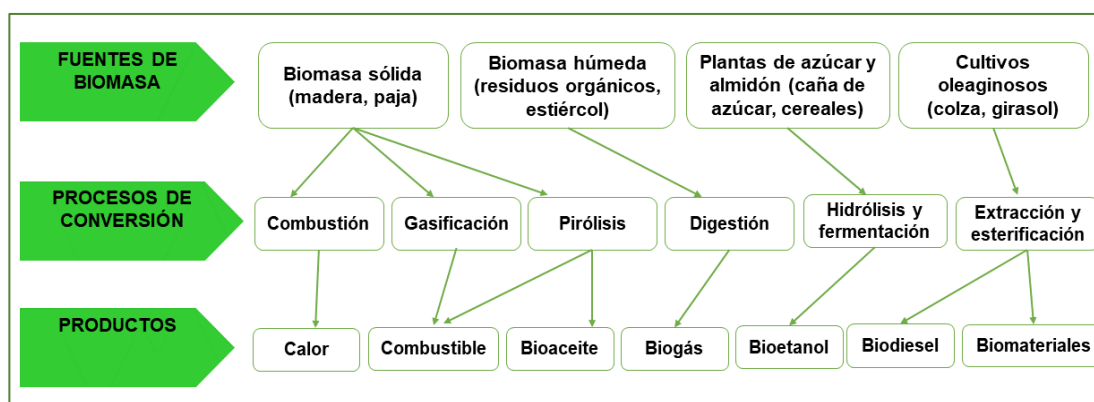


Figura 1. Procesos para convertir biomasa en energía y productos de interés

A partir de la biomasa se puede obtener energía en forma de calor, electricidad, combustibles, así como productos químicos tales como el metanol, fertilizantes y fibras sintéticas, con lo cual se le podría dar un valor agregado. Para lograr esta transformación de la biomasa es necesario realizar una serie de procesos, entre ellos se incluyen la combustión, digestión anaeróbica, gasificación, pirólisis, hidrólisis y fermentación, así como extracción y esterificación (Fig. 1). Es por ello que se considera a la biomasa como una de las materias primas más prometedoras para la producción de combustibles y otros productos químicos

(Periyasamy et al., 2022; Sarwer et al., 2022; Singh et al., 2022).

2.2 Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica (BLC) es un recurso renovable y abundante en la tierra. Se estima una producción anual a nivel mundial de 200 mil millones de toneladas, de las cuales sólo el 3% se utiliza en la industria de la celulosa y el resto se considera material de desecho (A.V.S.L Sai Bharadwaj et al., 2023).

Entre las principales fuentes de material lignocelulósico destacan los residuos agrícolas y de cultivos, como mazorcas de maíz, pajas de maíz, arroz, sorgo, bagazo de caña de azúcar, hojas de papa, residuos del prensado de aceite de colza y girasol, desechos de productos forestales tales como maderas, tallos, ramas y arbustos, desechos urbanos que incluyen los desechos de alimentos de restaurantes, hogares así como los desechos de la industria alimentaria y finalmente la biomasa acuática entre la que destacan las algas (Hassan et al., 2018; Hernández-Beltrán et al., 2019; Parveen et al., 2009).

La biomasa lignocelulósica puede transformarse en bioquímicos y biocombustibles de alto valor agregado en función de la naturaleza y composición de la materia prima seleccionada, así como de los métodos de pretratamiento biológicos y no biológicos empleados, es por ello que la BLC se considera como una alternativa adecuada para sustituir a largo plazo a los productos basados en combustibles fósiles (Banu et al., 2022; Kumar et al., 2022; Xiaoqui et al., 2022; Woiciechowski et al., 2020).

2.2.1 Composición química

La biomasa lignocelulósica se compone principalmente de biopolímeros como la celulosa (30-60%), hemicelulosa (14-40%) y lignina (7-25%) junto con una mínima cantidad de compuestos orgánicos como pectina, proteínas, lípidos, así como algunos extraíbles (taninos, resinas, esteroides, terpenos, terpenoides, flavonoides y otros compuestos fenólicos) (Okolie et al., 2021; Bhatia et al., 2019;

Dahadha et al., 2017; Putro et al., 2016; Yu et al., 2017). Los tres principales biopolímeros que constituyen la LCB se encuentran fuertemente asociados entre sí, mediante enlaces covalentes y puentes de hidrogeno, de tal manera que la celulosa se encuentra rodeada y fuertemente asociada a la hemicelulosa y lignina (Figura 2).

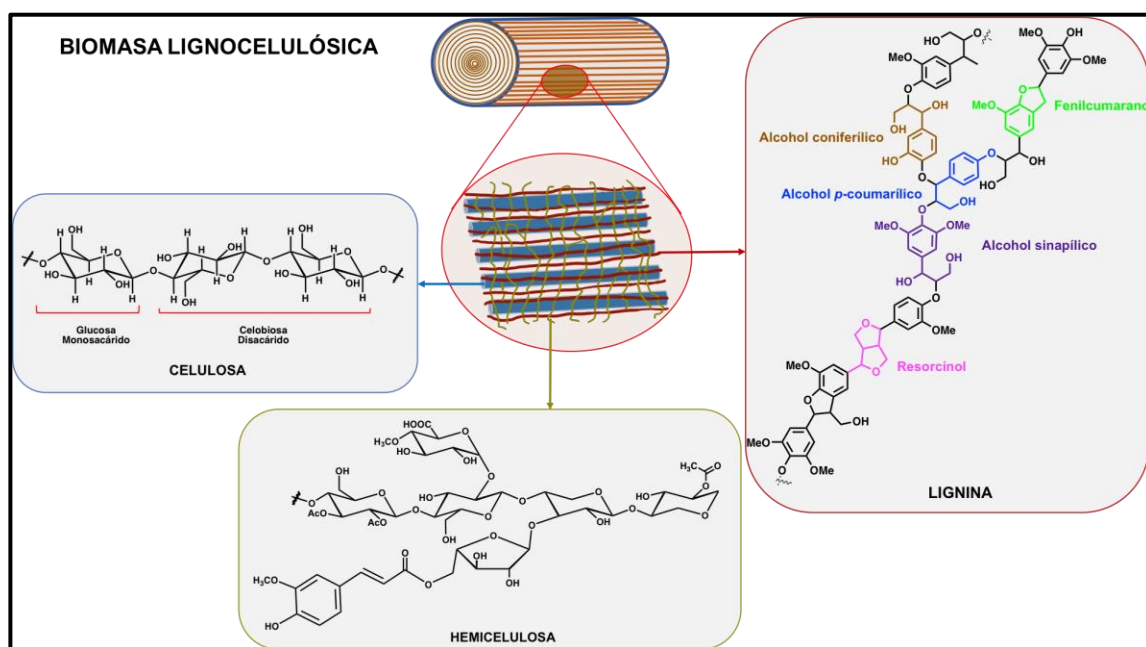


Figura 2. Componentes de la BLC (Fuente: García-Fernández, 2022).

Es importante mencionar que la disposición espacial que tomen estos biopolímeros puede variar ampliamente dependiendo de la fuente de biomasa lignocelulósica y de su composición (Cuadro 1).

Cuadro 1.Composición de diversas fuentes de biomasa lignocelulósica

Biomasa Lignocelulósica	Lignina (%)	Hemicelulosa (%)	Celulosa (%)	Referencia
Paja de trigo	22.2	26.9	43.4	Shah and Ullah, 2019
Paja de sorgo	10.2	32.5	26.9	Hernández-Beltrán et al., 2019
Paja de arroz	12.0	32.0	38.0	Huang et al., 2016; Hassan et al., 2018
Paja de cebada	13.1	28.7	35.4	Liu et al., 2017
Bagazo de caña de azúcar	11.4	31.1	43.1	Hernández-Beltrán et al., 2019
Mazorca de maíz	12.0	31.0	41.0	Kim, 2018; Liu et al., 2018
Cáscara de arroz	26.0	16.0	40.0	Hassan et al., 2018
Bambú	25.7	18.8	44.0	Chen et al., 2017

Adaptado de Usmani et al., 2020

2.2.2 Celulosa

La celulosa es un polisacárido estructural constituyente del más de 50% de las paredes celulares del reino vegetal, por lo cual es considerado como uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza (Yang & Chen, 2023). Puede obtenerse de una amplia gama de fuentes, incluidas plantas, madera, residuos agrícolas, desechos industriales, bacterias y algas (Ahmad Khorairi et al., 2021; Gabriel et al., 2020; García et al., 2016).

La celulosa es un homopolímero lineal que consta de una región amorfa y una cristalina, está formada por subunidades repetidas de D-glucosa unidas por

enlaces glicosídicos β -1,4(Kumar y Sharma, 2017), tal como se muestra en la Figura 3. Su peso molecular puede llegar a ser hasta de varios millones, además posee una alta resistencia mecánica y química que se debe al alineamiento de sus cadenas sobre un eje longitudinal estableciendo un gran número de puentes de hidrógeno intra e intermoleculares, lo que da origen a microfibrillas altamente estructuradas que corresponden a la región cristalina, mientras que el resto de la estructura, en donde no existe un orden, corresponde a la región amorfa (Dergal, 2006).

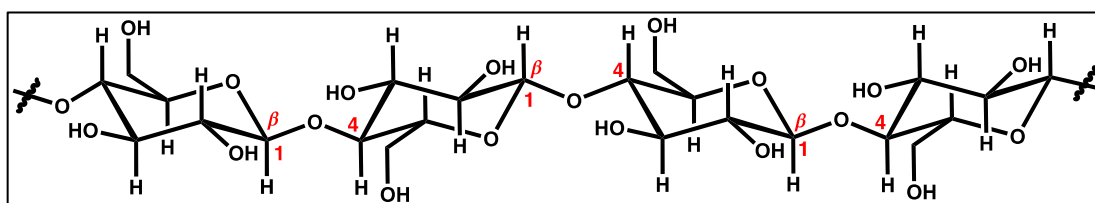


Figura 3. Subunidades de la celulosa

La celulosa posee algunos grupos hidroxilo activos en cada anillo de glucosa, por lo que esta puede participar en diversas reacciones químicas, incluidas la esterificación, la ciclización, la copolimerización por injerto, entre otras para generar los derivados de celulosa correspondientes para la producción de materiales nanométricos, productos químicos intermedios, fibras, compuestos, películas y biocombustibles (Jedvert y Heinze, 2017).

2.2.3 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un heteropolímero amorfo altamente ramificado que comparte junto con la celulosa una columna vertebral de enlaces glicosídicos (β -1-4) (Mujatba, 2023). Está conformada por pentosas (α -L-arabinosa y β -D-xilosa), hexosas (β -D-manosa, α -D-galactosa y β -D-glucosa), azúcares y ácidos de azúcar (α -D-4-O-metil-D-glucurónico, α -D-galacturónico y α -D-glucurónico) además de una mínima cantidad de otros azúcares como α -L-fucosa y L-ramnosa (Usmani et al., 2020; Geng et al., 2019).

En comparación con la celulosa, ésta se puede descomponer fácilmente en

monosacáridos debido a su naturaleza amorfa y su bajo grado de polimerización (Farhat et al., 2017). Generalmente las hemicelulosas son solubles en soluciones alcalinas concentradas (18-24% de NaOH o KOH), en presencia de estas soluciones y calentamiento las hemicelulosas pueden transformarse en moléculas plataforma de alto valor agregado, como furfural (FF), 5-hidroximetil furfural (5-HMF), ácido levulínico (LA) y ácido fórmico (FA) (Xiaoqui et al., 2022; Siankevich et al., 2014).

2.2.4 Lignina

El biopolímero de mayor abundancia en las plantas, después de la celulosa y la hemicelulosa es la lignina. En la biomasa lignocelulósica, es el componente que se encuentra en menor proporción con porcentajes que van desde un 7% hasta 25%. Se trata de un heteropolímero aromático conformado por un conjunto heterogéneo de polímeros complejos tridimensionales reticulados que tienen como subunidades a los alcoholes hidroxifenilo, siringilo y guaiacilo, los cuales que pueden variar en sus proporciones (Woiciechowski et al., 2020; Zhuang et al., 2016).

La lignina presenta una composición y estructura diferente dependiendo de la fuente de la que provenga, por ejemplo, en biomasa de fibras largas o bien maderas blandas, presentan una composición rica en guaiacilo (alcoholes coniferílicos) de aproximadamente el 90%, mientras que la lignina de hierbas, arbustos y pastos es rica en fracciones hidroxifenilo (alcoholes cumarílicos) y finalmente, las maderas duras que son ricas en siringilo (alcoholes sinapílicos). Es importante mencionar, que a la lignina se le asocia principalmente, lo recalcitrante de la biomasa lignocelulósica, ya que esta se une a la hemicelulosa mediante enlaces covalentes creando protección contra la acción de microorganismos y enzimas microbianas, inhibiendo así el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica cruda para extraer o elaborar de compuestos de interés, es por ello que en los últimos años se han estado realizando

investigaciones sobre pretratamientos químicos, físicos y biológicos para disminuir esta recalcitrancia y así facilitar su aprovechamiento.

2.3 Cáscara de cacao

La cáscara de mazorca de cacao (CMC), también llamada cocoa pod husk (CPH) por sus siglas en inglés, es la parte externa del fruto (exocarpo), la cual se caracteriza por ser áspera, oval y relativamente gruesa. Se encuentra una diversidad de colores (dependiendo de la variedad de cacao), lo que promueve la protección contra las condiciones ambientales, plagas y daños mecánicos. La CMC es el principal subproducto que se obtiene después de la eliminación de las semillas y representa el 70-75% del peso de la fruta fresca (Outtara et al., 2021; Lu, et al., 2018; Pérez et al., 2015).



Figura 4.Cacao (fruto completo)

2.3.1 Composición química de la CMC

De acuerdo al contenido químico de la cáscara de cacao presentada en el Cuadro 2., es importante destacar que la CPH es una fuente rica en material lignocelulósico (lignina, celulosa, hemicelulosa) pectina, minerales, así como en compuestos antioxidantes (ácidos fenólicos).

Cuadro 2. Composición química de la cáscara de cacao (g.100 g-1 materia seca).

Compuesto	Contenido en CMC (% P/P en materia seca)
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 (mg 100 g ⁻¹ Materia seca)
Minerales	3230.85

Fuente: García-Fernández, 2022; Vásquez et al., 2019

2.3.2 Usos y aprovechamiento de la CMC como fuente de material lignocelulósico

El interés por el uso y aprovechamiento de la CMC han aumentado en los últimos años, pues como se ha mencionado anteriormente, la cáscara de cacao presenta una importante composición lignocelulósica, por lo que a partir de ella y mediante el uso de tratamientos adecuados, se pueden obtener y generar productos de alto valor agregado (Valladares-Diestra et al., 2022; Campos-Vega, et al., 2018; Barazarte, et al., 2008).

La cáscara de cacao se ha empleado en la obtención y fabricación de jabones, carbón activado, alimento para ganado, fertilizante, sin embargo, estas aplicaciones son de bajo valor, por lo que en años recientes se le ha dado uso en aplicaciones con mayor valor agregado, entre estos se incluyen su uso para la fabricación de: a) Papel, sustituyendo fibras de CMC por fibras de madera (Daud

et al., 2013). Dado que la cáscara de cacao es rica en celulosa y presenta contenidos relativamente bajos de lignina, es un candidato adecuado para sustituir los recursos madereros en la fabricación de papel; b) biocombustibles: debido a que la CMC presenta un contenido importante de celulosa y hemicelulosa, polisacáridos con azúcares reductores (C5 y C6), como posibles fuentes para obtención de biocombustibles y moléculas plataforma (Valladares et al., 2021); c) Pectinas, pues de acuerdo con su composición química, la CMC es una importante fuente de fibras, que incluye pectinas, oligosacáridos y hemicelulosas (Yapo et al., 2013). En la industria alimenticia las pectinas son ingredientes de gran interés debido a sus propiedades gelificantes, espesantes y formadoras de películas, que ayudan a mejorar la constitución de algunos productos alimenticios. Hasta hace poco, se extraía pectina usando ácidos minerales (Chen et al., 2021), sin embargo, en los últimos años, se ha implementado la extracción de pectina asistida por microondas empleando ácidos orgánicos como el acético, cítrico y ascórbico con excelentes rendimientos, en procesos amigables con el medio ambiente y con menores riesgos para la salud (Sarah et al., 2022) y d) compuestos fenólicos: dado que la CMC es rica en lignina y compuestos antioxidantes, se pueden emplear varias metodologías para extraer estos compuestos y buscar su aplicación en diversas industrias. En un estudio realizado por Rachmawaty y colaboradores en 2019, se determinó el contenido fenólico total de dos extractos, uno en etanol (al 70%) y otro extracto de acetona : agua (7:3) lográndose valores de: 94.92 GAE/g, 49.92 GAE/g respectivamente. En otros estudios analíticos por LC-MS/MS realizados a la cáscara de cacao fresca, se han logrado identificar algunas moléculas de tipo fenólico como: catequinas, quercetinas, ácidos gálicos y cumáricos.

2.4 Pretratamientos para biomasa lignocelulósica

Como se ha descrito anteriormente, la biomasa lignocelulósica (BLC) presenta una estructura bastante compleja, en la que los dos polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) y el polímero fenólico (lignina) que la conforman, se encuentran fuertemente asociados, dando como resultado un material recalcitrante. Diversos

estudios han demostrado que la aplicación de pretratamientos a la biomasa lignocelulósica son un paso esencial para lograr una bioconversión eficiente de las materias primas lignocelulósicas. Los pretratamientos aplicados incluyen modificaciones estructurales que logran disminuir la recalcitrancia natural del material y mejorar su accesibilidad y digestibilidad (Zhao et al., 2022).

El objetivo principal de los pretratamientos es descomponer la BLC en sus principales componentes: celulosa, hemicelulosa y lignina (Kumari y Singh, 2018). Durante estos procesos hay un porcentaje importante de delignificación de la BLC, lo que favorece la susceptibilidad al ataque por microorganismos y enzimas de las fracciones de polisacáridos que la conforman, además de una reducción en la cristalinidad de la celulosa, lo cual se ve reflejado en un incremento en la porosidad del material lignocelulósico. La efectividad de un pretratamiento va a estar en función de algunos parámetros, tales como la formación de azúcares por hidrólisis, la menor o nula degradación de los azúcares obtenidos, la menor o nula formación de productos inhibitorios, así como por la reducción en la demanda de energía y costos en la obtención de los productos de interés (Abraham et al., 2020).

Existen diversos métodos de pretratamientos de biomasa lignocelulósica, lo cuales se clasifican de manera general en 4 grupos (Figura 5): pretratamientos físicos, químicos, biológicos y la combinación de dos o más de ellos (Zhang et al., 2023). Es importante mencionar que el tipo de pretratamiento a emplear va a depender en gran medida del tipo, naturaleza, origen de la biomasa, así como de su uso en procesos de biorrefinería y bioconversión (Kumar et al., 2023).



Figura 5. Métodos más empleados en el pretratamiento de biomasa lignocelulósica (Fuentes: Hassan et al., 2018; Singh et al., 2018; Tu y Hallett, 2019).

2.4.1 Pretratamientos químicos.

Los pretratamientos químicos son uno de los métodos más empleados por su eficiencia y selectividad en la ruptura de enlaces que conforman la biomasa lignocelulósica dando como resultado la disolución (despolimerización) de la BLC en un tiempo relativamente corto. La aplicación de estos pretratamientos incluye el uso de ácidos, álcalis, solventes orgánicos, agentes oxidantes y líquidos iónicos (Vaithyanathan, Goyette y Rajagopa, 2023). En la Tabla 3 se muestran algunas sustancias químicas empleadas y su efecto en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica. Estos pretratamientos presentan algunas desventajas en cuanto a costos, toxicidad, contaminación ambiental, así como por la formación de productos inhibitorios.

Cuadro 3. Pretratamientos químicos y su efecto en la biomasa lignocelulósica

Pretratamiento químico	Reactivos	Efecto en la BLC
Alcalino	H ₂ O ₂ , NaOH, Na ₂ SO ₃ , Na ₂ S, (CaOH ₂), Na ₂ CO ₃ , NH ₄ OH	Alta eliminación de lignina, incremento de la holocelulosa, mayor porosidad de la biomasa e hinchamiento de la celulosa.
Ácido	H ₂ SO ₄ , ácido peracético, HCl	Eliminan la fracción de hemicelulosa, aumentan la cristalinidad de la biomasa, libera azúcares monoméricos
Líquidos iónicos	[Bmim][OAc], [bmim][Cl], [emim][OAc], [emim][CH ₃ COOH], [emim][DEPO ₄], [dmim][MeSO ₄], [amim][Cl], [DMSO/LiCl], [Bmpy][Cl]	Debilitan la interacción de Van der Waals entre los polímeros de la pared celular, interrumpe los enlaces arabinoxilano-lignina, altera la estructura fibrilar de la pared celular, disminuye la cristalinidad de la celulosa y aumenta la accesibilidad a la superficie de la celulosa.
Solventes orgánicos	Acetato de etilo, etanol, ácido acético, ácido fórmico.	Rompe los enlaces internos de lignina y hemicelulosa, aumentando el volumen de los poros y la superficie de la biomasa.
Surfactantes	Polietilenglicol, Tween 80, Tween 20, dodecilsulfato de sodio (SDS), bromuro de dodeciltrimetilamonio (DoTAB), Triton X-100, Triton X-114, Agrimul NRE 1205, HM-EOPO, anfotérico Anhitole 20BS, Neopelex F-25	Alterar la estructura de la biomasa, aumentar la interacción entre la holocelulosa y la enzima, reducir la adsorción de la enzima en la lignina.

Adaptado de Putro et al., 2016

2.4.2 Pretratamientos físicos.

Existen varios métodos de pretratamiento físico empleados en el tratamiento de la biomasa lignocelulósica, tales como la molienda, el astillado, la congelación, la radiación por microondas y la ultra sonicación. Estos métodos se basan en el uso

de fuerzas mecánicas y eléctricas que se encargan de disminuir el tamaño de partícula, incrementando la porosidad y el área superficial de las cadenas poliméricas constituyentes de la BLC. En un estudio realizado por Abánades y col. (2017) se evaluó el pretratamiento de un molino de bolas en los residuos forestales postcosecha del abeto Douglas, dando como resultado una reducción de la cristalinidad de la celulosa del 40,73 % al 11,70 %, lo que a su vez provocó un aumento significativo en los rendimientos de conversión de celulosa posteriores. Es importante mencionar que la mayoría de los pretratamientos físicos no son efectivos por sí solos, por lo que se requiere su combinación con otros pretratamientos para mejorar su efectividad. Además, estos métodos tienen la desventaja de presentar altos costos energéticos.

2.4.3 Pretratamientos biológicos.

Los pretratamientos biológicos se consideran procesos ecológicos ya que, a diferencia de los pretratamientos físicos y químicos, estos no requieren de altos costos operativos ni de grandes espacios para su implementación, además los subproductos generados no son inhibitorios ni tóxicos al medio ambiente, sin embargo, presenta la desventaja de tener una baja eficiencia debida a los largos tiempo de hidrólisis, así como a la baja recuperación de celulosa (Zhao et al., 2022). Estos pretratamientos se basan en el uso de enzimas y microorganismos seleccionados (Andlar et al., 2018), que sean capaces de degradar la lignina y la hemicelulosa en la BLC. Los microorganismos más empleados son los hongos de pudrición blanca y parda, ya que estudios han demostrado que estos son capaces de atacar tanto a la celulosa como a la lignina (Fan et al., 2012; Zabed et al., 2019). Es importante mencionar, que un pretratamiento biológico directo de la BLC resulta poco eficiente, debido a la dificultad de las enzimas y microorganismos para romper el complejo lignina-celulosa-hemicelulosa, por lo que es necesario la combinación con un pretratamiento físico o químico antes del proceso microbiano o enzimático y así hacer más eficiente el proceso..

2.4.4 Pretratamientos combinados.

Como se ha mencionado anteriormente, la aplicación de un solo pretratamiento no es del todo eficiente e incluso algunos presentan más inconvenientes que otros, es por ello, que en los últimos años las investigaciones se han enfocado en el uso de dos o más pretratamientos en conjunto para el tratamiento de BLC y así superar los inconvenientes que estos presentan por sí solos. Entre los pretratamientos combinados más aplicados se encuentra el uso de ácidos, álcalis, solventes orgánicos y líquidos iónicos seguido de un pretratamiento biológico, o bien asistidos por calentamiento en microondas, ultra sonicación, explosión de vapor, los cuales han demostrado mayor eficiencia en la eliminación de lignina, la reducción de la cristalinidad de la celulosa y por ende una mayor producción de azúcares, así como menores tiempos de proceso y una menor formación de productos inhibidores (Kumari y Singh, 2018). Por ejemplo, en un estudio realizado por Tanpichai y col. (2019), se demostró que, mediante un pretratamiento por explosión de vapor a 215°C, 2MPa durante 5 minutos, se logró eliminar más del 80% de la lignina de las fibras de las hojas de piña.

2.5 Metodologías verdes (Química verde)

Actualmente nos encontramos ante una crisis climática y energética que cada vez va en mayor auge, por ello es necesario crear conciencia sobre el uso eficiente de recursos, así como de mitigar el impacto ambiental que generan diversos procesos. En el contexto de la química, surge a principios de los años 1990 el concepto de “química verde” (Green chemistry), que básicamente consiste en el desarrollo de metodologías para modificar la naturaleza intrínseca de productos o procesos con la finalidad de reducir los riesgos que estos involucren tanto para el ambiente como para la salud humana (Savitskaya et al., 2021; Anastas y Warner, 2005). En el año de 1999 P. Anastas y J.C. Warner desarrollaron 12 principios (Figura 6) para la evaluación de la química verde, los cuales fueron desarrollados con respecto a los procesos síntesis química, de tal manera que estos se enfocan principalmente, en mejorar la eficiencia de la

reacción, reducir el uso de reactivos tóxicos, prevenir la generación de subproductos tóxicos, esto coadyuvado del monitoreo del proceso en tiempo real, así como evitar la contaminación ambiental y minimizar el consumo de energía (Shi et al., 2023). Todos estos principios se volvieron aplicables a una serie de procesos industriales, que van más allá de la síntesis química.

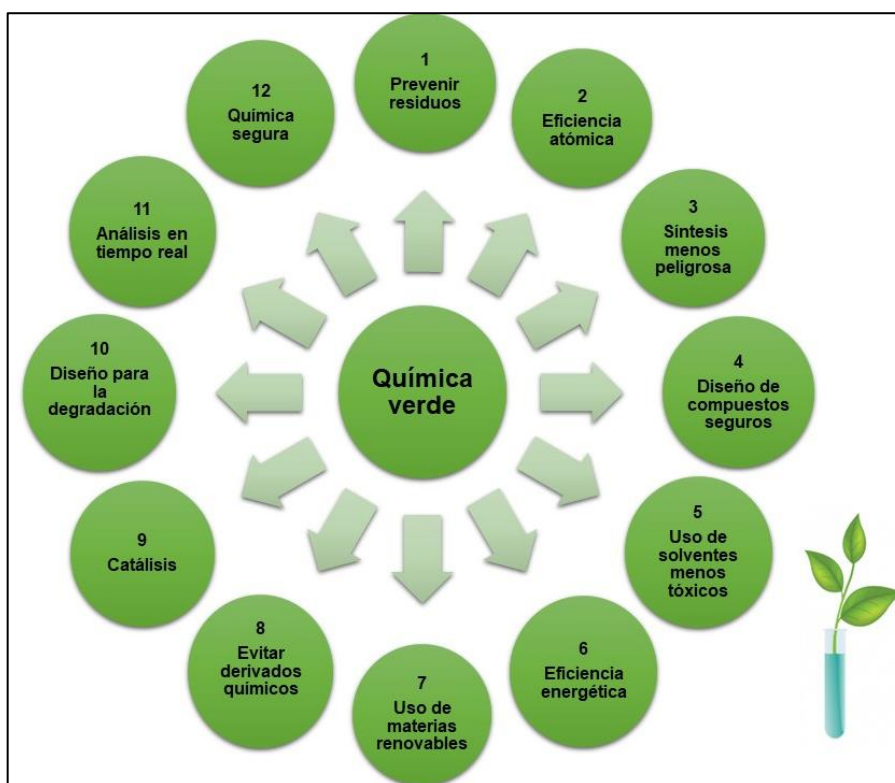


Figura 6. Los 12 principios de la Química verde

En este contexto, cabe resaltar que el uso de métodos convencionales en el pretratamiento de biomasa lignocelulósica presenta desventajas como lo son los altos costos económicos, energéticos, así como ambientales, es por ello que es necesario el desarrollo de nuevas tecnologías que tengan en cuenta los 12 principios de la química verde que puedan ser empleados para el pretratamiento de estos materiales lignocelulósicos de una manera más sostenible y eficiente. Actualmente han surgido una serie de procesos y metodologías para el pretratamiento de BLC que son respetuosos con el medio ambiente y que además son compatibles con los procesos posteriores de hidrólisis y

fermentación de la BLC, entre estos se encuentran los pretratamientos bioquímicos, pretratamientos con el uso de LI's, disolventes eutécticos y fluidos supercríticos (Zhao et al., 2022).

2.6 Líquidos iónicos y sus propiedades fisicoquímicas

Los líquidos iónicos (LI's) emergen como una nueva clase de “disolventes verdes”, candidatos a sustituir los disolventes orgánicos volátiles tradicionales debido a sus propiedades ecológicas, tales como la baja presión de vapor y la no inflamabilidad, además de que su aplicación no forma productos químicos peligrosos y a que es posible una recuperación de hasta aproximadamente el 100% del LI empleado (Brandt-Talbot et al., 2017).

En 1914, Paul Walden sintetizó el primer líquido iónico: nitrato de etilamonio ($[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$) con un punto de fusión de 12°C , a partir de entonces ha existido un amplio desarrollo en el campo de estudio y síntesis de nuevos LI's (Reddy et al., 2022; Tomar y Jain, 2022). Los líquidos iónicos se definen como sales orgánicas con puntos de fusión por debajo de los 100°C , lo cual hace que estas se presenten en forma líquido a temperatura ambiente y sean más fáciles de trabajar. Están conformados por un catión orgánico y por un anión, generalmente inorgánico, pero también puede ser orgánico, en la figura 7 se muestran los cationes y aniones más usados. En este sentido es importante mencionar, que el catión y los sustituyentes del imidazol, influyen en las propiedades generales de los líquidos iónicos como lo son: estabilidad, viscosidad, densidad y tensión superficial entre otras.

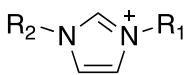
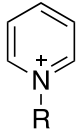
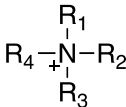
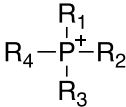
Cationes comunes	Aniones comunes
   	F^- Cl^- I^- BF_4^- PF_6^- AlCl_4^- CH_3COO^- CF_3COO^- CH_3SO_3^- $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{NO}_2\text{SCF}_3^-$

Figura 7..Principales cationes y aniones usados en la síntesis de líquidos iónicos

Los líquidos iónicos presentan propiedades fisicoquímicas únicas, que los diferencian del resto de disolventes, entre ellas se encuentran su baja presión de vapor, su prácticamente nula inflamabilidad, alta conductividad iónica, alta viscosidad, alta rango de estabilidad térmica y química, una gran capacidad de solvatación, bajos puntos de fusión, hidrofiliidad, hidrofobicidad, carácter ácido/base. Además, la mayoría son económicos, no corrosivos, presentan buena biodegradabilidad, son reutilizables y no tóxicos (Sibalic et al., 2023; Bhatia et al., 2019; Yoo et al., 2017). Estas propiedades fisicoquímicas que presentan los LI's se consideran ajustables, ya que dependiendo de la aplicación para la cual se requieran se puede diseñar una combinación específica de catión y anión que sea apropiado para proceso deseado, por ello es de gran importancia conocer la relación estructura-propiedad fisicoquímica, ya que se ha observado que incluso pequeños cambios en la estructura traen consigo cambios drásticos en las propiedades de los LI's. Finalmente, es importante mencionar que, debido a su amplia gama de propiedades fisicoquímicas, los LI's son capaces de disolver compuestos polares, no polares, orgánicos, inorgánicos, así como materiales poliméricos, de tal manera que presentan gran aplicación a nivel industrial en los campos de la electroquímica, la ingeniería de reacciones catalíticas, la extracción y separación de materiales, la absorción de gases y el refinado de biomasa.

2.6.1 Uso potencial de los líquidos iónicos en el pretratamiento de biomasa lignocelulósica

En los últimos años, debido a sus importantes propiedades fisicoquímicas y ecológicas, los líquidos iónicos se consideran como una nueva generación de solventes con un gran potencial para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica (BLC), ya que, si bien existen otros procesos que también pueden considerarse verdes, como lo es el uso de fluidos supercríticos, la explosión de vapor, los LI's presentan la ventaja de poderse diseñar con cationes y aniones específicos, de acuerdo con su aplicabilidad.

El uso de LI's como pretratamiento ayudara en el fraccionamiento y disolución del material lignocelulósico, mediante su capacidad de formar enlaces de hidrógeno, para extraer los principales componentes de este material de una manera limpia, no inflamable, en fase líquida y a temperatura ambiente (Jędrzejczyk et al., 2019; Mesa et al., 2017). Es importante resaltar que la disolución de los tres principales biopolímeros que constituyen la BLC va a depender en gran medida de factores como la estructura del LI, el tipo de BLC, las temperaturas, tiempos, humedad, viscosidad, relación estequiométrica con el soluto/solvente, así como del tamaño de partícula (Dopico-Ramírez et al., 2013). Hasta la fecha, múltiples investigadores han aplicado y estudiado una gran variedad de LI's en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, destacando aquellos que están elaborados a base de imidazolio. En 2016, Li y col. emplearon acetato de 1-butil-3-metilimidazolio [Bmim][OAc] para el pretratamiento de eucalipto seguido de un tratamiento con hidróxido de sodio, los resultados mostraron una separación de lignina y una producción de glucosa al 90,53%, la mayor liberación de glucosa se atribuyó a la mejor accesibilidad dada por el líquido iónico, que incremento la superficie reactiva de la biomasa. En otro estudio, Paul y Chakraborty (2018) emplearon líquidos iónicos asistido con calentamiento en microondas para el pretratamiento de la fibra de cáñamo Sunn para la producción de biocombustibles, este pretratamiento permitió formar entre los reactivos empleados (celulosa de cadena larga, líquido iónico, catalizador de

metal de transición y agua) un complejo supramolecular polar que giraba bajo la polaridad alterna del microondas, disipando la energía electromagnética a través de colisiones moleculares, acelerando así la rotura del enlace glicosídico, por lo que al final se obtuvo 595g de glucosa a partir de 1kg de fibra de cáñamo y un rendimiento de la producción de bioetanol del 75.6% tras el pretratamiento aplicado. En otro estudio reciente, Poy y colaboradores (2023), exploraron el potencial de los líquidos iónicos próticos (PIL) en el pretratamiento de paja de arroz (fuente de biomasa lignocelulósica) con respecto a su efectividad de fraccionamiento y la mejora del rendimiento de sacarificación. Los resultados obtenidos mostraron que PIL [MEOA][OAc] mostró la mayor eficiencia en la extracción de lignina (98 % des lignificación) junto con una gran recuperación de azúcar (93 % glucano y 90 % polisacáridos C5).

2.7 Métodos de caracterización de biomasa lignocelulósica pretratada con LI

Como se ha mencionado anteriormente, la biomasa lignocelulósica presenta una composición y características bastante heterogéneas, las cuales dependen en gran medida de los biopolímeros que la constituyen: celulosa, hemicelulosa y lignina. La cantidad de cada uno de los biopolímeros que la conforman va a ser variable, dependiendo de la fuente de la que provenga, su origen, condiciones climáticas entre otras (Kumar et al., 2023). Además, después de los pretratamientos aplicados para su bioconversión, la BLC presentará cambios importantes que ayudaran a diferenciar entre la biomasa inicial, los subproductos generados y el grado de eficiencia del pretratamiento aplicado, por ello es de suma importancia realizar una caracterización de la BLC previo y posterior a su conversión, ya sea de manera cualitativa o cuantitativa. Existen diversos métodos que permiten caracterizar la biomasa pretratada, tales como la caracterización de compuestos orgánicos mediante análisis infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR), la caracterización estructural mediante difracción de rayos-X, la resonancia magnética nuclear, la microscopia electrónica de barrido (SEM), así como la caracterización termoquímica, mediante análisis termogravimétricos,

cromatografía de gases y calorimetría, sin embargo, para objeto del presente estudio, únicamente se analizará la caracterización mediante FT-IR y SEM de biomasa pretratada (particularmente con LI's).

2.7.1. Caracterización de compuestos orgánicos por FT-IR de biomasa pretratada

La caracterización de la BLC pretratada por FT-IR se emplea para determinar grupos funcionales de los compuestos orgánicos presentes en la biomasa, para determinar modificaciones en las estructuras, además permite observar de manera cualitativa, la eliminación de componentes como la lignina y la hemicelulosa ya sea por la aparición o eliminación de bandas, esta técnica se basa en el principio de absorción de la luz por los compuestos orgánicos dentro de la región infrarroja en el rango de 400 y 4000 cm^{-1} , en donde los enlaces de absorción y vibración generan picos porcentuales de transmitancia que son representados mediante espectros. En la Tabla 7 se muestran las principales bandas espectrales de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para grupos funcionales de BLC.

Cuadro 4. Principales bandas espectrales de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para grupos funcionales de BLC

Longitud de onda	Grupo funcional	Estructura correspondiente
3400-3500	Estiramiento y vibración: O-H en celulosa	Celulosa, hemicelulosa, lignina
3444	Estiramiento y vibración: O-H en celulosa (biomasa no tratada)	Celulosa, hemicelulosa, lignina
3466	Estiramiento y vibración: O-H en celulosa (BLC pretratada con LI's), incremento de la banda por puentes de hidrógeno con los grupos O-H	Celulosa, hemicelulosa, lignina
3367	Estiramiento O-H	Celulosa, hemicelulosa, lignina
3125-3600	Estiramiento O-H	Celulosa, hemicelulosa, lignina
2914	Estiramiento C-H	Celulosa, hemicelulosa, lignina

Cuadro 4. Principales bandas espectrales de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para grupos funcionales de BLC (cont.)

2950-2850	Vibración C-H simétrica y asimétrica de metilo (-CH ₃) y metileno (-CH ₂)	Celulosa, hemicelulosa, lignina
1745	Estiramiento C=O	hemicelulosa, lignina
1730	Absorción de restos de acetilo en hemicelulosa	Hemicelulosa
1618	Estiramiento C=O en carboxilo conjugado; Absorción O-H	hemicelulosa, lignina
1635	Estiramiento C=O aromáticos de lignina	Lignina
1514	Vibración: C=C guayacilo aromáticos	Lignina
1508	Estiramiento y vibración Anillo aromático C=C-C	Lignina
1457	Deformación C-H (meti y metileno)	Lignina
1424	Vibración de flexión simétrica en -CH ₂	Celulosa, hemicelulosa, lignina
1430	Absorción: - CH ₂ , vibración de flexión	Celulosa y celulosa derivada
1370	Flexión: C-H; Estiramiento en -CH ₃	Celulosa, hemicelulosa, lignina
1317		Lignina
1235	Estiramiento: C-O en Guayacilo	Celulosa, hemicelulosa
1160	Estiramiento C-O-C	Celulosa
1162	Estiramiento C-O-C asimétrico en celulosa pretratada	Lignina
1108	Deformación: C-H aromático	Celulosa, hemicelulosa, lignina
1053	Vibración de estiramiento: C-OH; Deformación: C-O	Celulosa, hemicelulosa, lignina
1042	Estiramiento y vibraciones: -CH ₂ OH y C-O (biomasa pretratada)	Celulosa, lignina
897-900	Estiramiento: C-O-C Celulosa amorfa	celulosa
896	Estiramiento: C-O-C	Celulosa, hemicelulosa
846	Flexión: aromático C-H	Lignina

Adaptado de: Azizan et al., 2022

2.7.2. Caracterización estructural (morfológica) por microscopia electrónica de barrido (SEM) de biomasa pretratada

La caracterización estructural de muestras se realiza mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido, el cual permite la observación y caracterización superficial de materiales orgánicos e inorgánicos en una representación gráfica que se genera a partir del escaneo de la superficie de la muestra al hacer enfocar un haz de electrones que se conecta con la muestra

para producir señales y así obtener información sobre la morfología y composición de la superficie en estudio. Es importante mencionar que previo al análisis de muestras es necesario realizar un pretratamiento de reducción de tamaño de partícula, además de eliminar la humedad para evitar interferencias durante la toma de imágenes. Diversos estudios han empleado esta técnica para caracterizar sus muestras pretratadas, tal es el caso de Poy y col (2023), quienes caracterizaron muestras de paja de arroz pretratada con [Emim] [OAc], los resultados obtenidos mostraron una estructura empaquetada y altamente ordenada, con material particulado en la superficie asociado con su contenido de sílice, para el material sin pretratar, mientras que la muestra pretratada mostró un aumento de la superficie en donde se observó una apariencia fibrosa que presentó poros o “hoyos” en la superficie, lo que asocio a la penetración del LI y a la eliminación de lignina y cenizas.

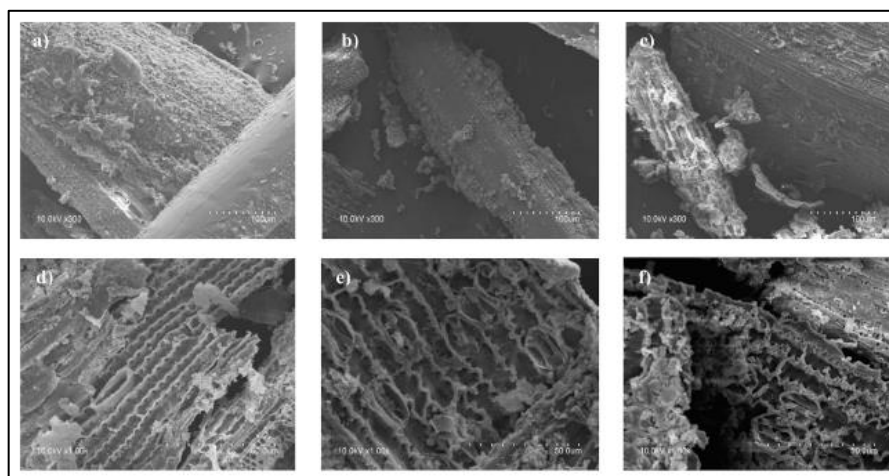


Figura 8. Imágenes SEM de paja de arroz: a) Sin pretratamiento; b)-d) pretratadas con dos líquidos iónicos a diferentes tiempos y temperaturas de reacción. (Fuente: Poy et al., 2023)

2.7 Literatura citada

- Abanades, J. C., Rubin, E. S., Mazzotti, M., & Herzog, H. J. (2017). On the climate change mitigation potential of CO₂ conversion to fuels. *Energy & environmental science*, 10(12), 2491–2499. <https://doi.org/10.1039/c7ee02819a>
- Abraham, A., Mathew, A. K., Park, H., Choi, O., Sindhu, R., Parameswaran, B., Pandey, A., Park, J. H., & Sang, B.-I. (2020). Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 301(122725), 122725. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122725>
- 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>
- 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>
- Ahmad Khorairi, A. N. S., Sofian-Seng, N.-S., Othaman, R., Abdul Rahman, H., Mohd Razali, N. S., Lim, S. J., & Wan Mustapha, W. A. (2021). A review on Agro-industrial waste as cellulose and nanocellulose source and their potentials in food applications. *Food Reviews International*, 1–26. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1926478>

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>
- Anastas, N. D., & Warner, J. C. (2005). The incorporation of hazard reduction as a chemical design criterion in green chemistry. *Chemical Health & Safety*, 12(2), 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.chs.2004.10.001>
- Andlar, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., & Šantek, B. (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences*, 18(11), 768–778. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800039>
- Antwi, E., Engler, N., Nelles, M., & Schüch, A. (2019). Anaerobic digestion and the effect of hydrothermal pretreatment on the biogas yield of cocoa pods residues. *Waste Management (New York, N.Y.)*, 88, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.03.034>
- Azizan, A., Jusri, N. A. A., Azmi, I. S., Abd Rahman, M. F., Ibrahim, N., & Jalil, R. (2022). Emerging lignocellulosic ionic liquid biomass pretreatment criteria/strategy of optimization and recycling short review with infrared spectroscopy analytical know-how. *Materials Today: Proceedings*, 63, S359–S367. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.03.548>
- A.V.S.L Sai Bharadwaj, Subhabrata Dev, Jingshun Zhuang, Yunxuan Wang, Chang Geun Yoo, Byong-Hun Jeon, Srijan Aggarwal, Seung Hyun Park, Tae Hyun Kim. (2023). Review of chemical pretreatment of lignocellulosic biomass using low-liquid and low-chemical catalysts for effective bioconversion. *Bioresource Technology*, 368, 128339. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128339>
- Banu Jamaldheen, S., Kurade, M.B., Basak, B., Yoo, C.G., Keun, OhK., Jeon, B.-H., Kim, T. H. (2022). A review on Physico-chemical delignification as a pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced bioconversion. *Bioresource Technology*, 346.
- Barazarte H, Sangronis E, Unai E. (2008) La cáscara de cacao (Theobroma cacao L): Una posible fuente comercial de pectinas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58(1),64- 70.
- Bhan M., Satija S., Garg C., Dureja H., Garg M. (2017). Optimization of ionic liquid-based microwave assisted extraction of a diterpenoid lactone-

andrographolide from *Andrographis paniculata* by response surface methodology. *Journal of Molecular Liquids* 229, 161–166.

- Bhatia, S.K., Jagtap, S.S., Bedekar, A.A., Bhatia, R.K., Patel, A.K., Pant, D.J., Banu, R., Rao, C.V., Kim, Y.-G., Yang, Y.-H. (2019). Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: effect of key parameters, technological improvements, and challenges. *Bioresource Technology*, 122724.
- Brandt-Talbot, A., Gschwend, F. J. V., Fennell, P. S., Lammens, T. M., Tan, B., Weale, J., & Hallett, J. P. (2017). An economically viable ionic liquid for the fractionation of lignocellulosic biomass. *Green chemistry: an international journal and green chemistry resource: GC*, 19(13), 3078–3102. <https://doi.org/10.1039/c7gc00705a>
- Campos-Vega, 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>
- 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>
- Dahadha, S., Amin, Z., Lakeh, B.A.A., Elbeshbishy, E. (2017). Evaluation of different pretreatment processes of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production. *Energy Fuel* 31, 10335–10347.
- 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.
- Dergal, S. B. (2006). *Química de Los Alimentos*. Pearson Publications Company.
- Fantoni T., Tolomelli A. & Cabri W. (2021). A translation of the twelve principles of green chemistry to guide the development of cross-coupling reactions.

Catalysis Today xxx (xxxx), xxx.

- Fan, L. T., Gharpuray, M. M., & Lee, Y. H. (2012). Cellulose hydrolysis (Vol. 3). Springer Science & Business Media.
- Farhat, W., Venditti, R. A., Hubbe, M., Taha, M., Becquart, F., & Ayoub, A. (2017). A review of water-resistant hemicellulose-based materials: Processing and applications. *ChemSusChem*, 10(2), 305–323. <https://doi.org/10.1002/cssc.201601047>
- Fonseca, B. G., Mateo, S., Roberto, I. C., Sánchez, S., & Moya, A. J. (2020). Bioconversion in batch bioreactor of olive-tree pruning biomass optimizing treatments for ethanol production. *Biochemical Engineering Journal*, 164(107793), 107793. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107793>
- Gabriel, T., Belete, A., Syrowatka, F., Neubert, R. H. H., & Gebre-Mariam, T. (2020). Extraction and characterization of celluloses from various plant byproducts. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 1248–1258. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.264>
- García, A., Gandini, A., Labidi, J., Belgacem, N., & Bras, J. (2016). Industrial and crop wastes: A new source for nanocellulose biorefinery. *Industrial Crops and Products*, 93, 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.06.004>
- García-Fernández, S. (2022). Caracterización de lignina de cáscara de cacao como fuente de moléculas de alto valor agregado. [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Chapingo].
- Geng, W., Narron, R., Jiang, X., Pawlak, J. J., Chang, H.-M., Park, S., Jameel, H., & Venditti, R. A. (2019). The influence of lignin content and structure on hemicellulose alkaline extraction for non-wood and hardwood lignocellulosic biomass. *Cellulose (London, England)*, 26(5), 3219–3230. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02261-y>
- Green chemistry by Paul T. anastas and John C. warner. Oxford university press: Oxford. 2000. Paperback. 135 pp. £14.99. ISBN 0-19-850698-9. (2000). *Organic Process Research & Development*, 4(5), 437–438. <https://doi.org/10.1021/op000054t>

- Hassan, S. S., Gwilym, A., Williams, Jaiswa IA. K. (2018). Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 262,310–318.
- Hernández-Beltrán, J. U., Hernández-De Lira, I. O., Cruz-Santos, M. M., Saucedo-Luevanos, A., Hernández-Terán, F., & Balagurusamy, N. (2019). Insight into pretreatment methods of lignocellulosic biomass to increase biogas yield: Current state, challenges, and opportunities. *Applied Sciences (Basel, Switzerland)*, 9(18), 3721. <https://doi.org/10.3390/app9183721>
- Hernández-Mendoza, A. G., Saldaña-Trinidad, S., Martínez-Hernández, S., Pérez-Sariñana, B. Y., & Láinez, M. (2021). Optimization of alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis of cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.) for ethanol production. *Biomass & Bioenergy*, 154(106268), 106268. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106268>
- Huang, Y.-F., Chiueh, P.-T., & Lo, S.-L. (2016). A review on microwave pyrolysis of lignocellulosic biomass. *Sustainable Environment Research*, 26(3), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.serj.2016.04.012>
- 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>
- Jędrzejczyk, M., Soszka, E., Czapnik, M., Ruppert, A.M., Grams, J. (2019). Chapter 6 – Physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass. In Basile, A. (Ed.), *Second and Third Generation of Feedstocks*. Elsevier, F.Dalena, pp. 143-196.
- Jedvert, K., & Heinze, T. (2017). Cellulose modification and shaping – a review. *Journal of Polymer Engineering*, 37(9), 845–860. <https://doi.org/10.1515/polyeng-2016-0272>
- Kim, D. (2018). Physico-chemical conversion of lignocellulose: inhibitor effects and detoxification strategies: a mini review. *Molecules*, 23 (2), 309.
- Kothari, R., Singh, A., & Arora, N. K. (Eds.). (2022). *Biomass, Bioenergy & Bioeconomy*. SPRINGER VERLAG, SINGAPOR.
- Kumar, J. A., Sathish, S., Prabu, D., Renita, A. A., Saravanan, A., Deivayanai, V. C., Anish, M., Jayaprabakar, J., Baigenzhenov, O., & Hosseini-

- Bandegharai, A. (2023). Agricultural waste biomass for sustainable bioenergy production: Feedstock, characterization and pre-treatment methodologies. *Chemosphere*, 331(138680), 138680. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138680>
- Kumar, R., Kim, T.H., Bikram, B., Swapnil, M.P., Kim, H.H., Yongtae, A., Krishna Kumar, Y., Cabral-Pinto, M.M.S., Jeon, B.-H. (2022). Emerging approaches in lignocellulosic biomass pretreatment and anaerobic bioprocesses for sustainable biofuels production. *J. Clean. Prod.* 333, 130180.
- 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>
- Kumar, A. K., & Sharma, S. (2017). Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0137-9>
- Kumari, D. y Singh, R. (2018). Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, 877–891.
- 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, Z., Li, L., Liu, C., Xu, A., 2018. Pretreatment of corn straw using the alkaline solution of ionic liquids. *Bioresour. Technol.* 260, 417–420.
- Lin, X., Jiang, K., Liu, X., Han, D., & Zhang, Q. (2022). Review on development of ionic liquids in lignocellulosic biomass refining. *Journal of Molecular Liquids*, 359(119326), 119326. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119326>
- 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>
- 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>.

Mehedintu A, Sterpu M, Soava G. (2018). Estimation and Forecasts for the Share of Renewable Energy Consumption in Final Energy Consumption by 2020 in the European Union. *Sustainability*. 10(5):1515. <https://doi.org/10.3390/su10051515>

Mesa, L., Martínez, Y., Barrio, E., González, E. (2017). Desirability function for optimization of Dilute Acid pretreatment of sugarcane straw for ethanol production and preliminary economic analysis based in three fermentation configurations. *Applied Energy*, 198, 299-311.

Mikulski, D., & Kłosowski, G. (2023). High-pressure microwave-assisted pretreatment of softwood, hardwood and non-wood biomass using different solvents in the production of cellulosic ethanol. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02272-9>

Mujtaba, M., Fernandes Fraceto, L., Fazeli, M., Mukherjee, S., Savassa, S. M., Araujo de Medeiros, G., do Espírito Santo Pereira, A., Mancini, S. D., Lipponen, J., & Vilaplana, F. (2023). Lignocellulosic biomass from agricultural waste to the circular economy: a review with focus on biofuels, biocomposites and bioplastics. *Journal of Cleaner Production*, 402(136815), 136815. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.136815>

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*.

Okolie, J. A., Nanda, S., Dalai, A. K., & Kozinski, J. A. (2021). Chemistry and specialty industrial applications of lignocellulosic biomass. *Waste and Biomass Valorization*, 12(5), 2145–2169. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01123-0>

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>

Ouellet, M., Datta, S., Dibble, D. C., Tamrakar, P. R., Benke, P. I., Li, C., & Mukhopadhyay, A. (2011). Impact of ionic liquid pretreated plant biomass on *Saccharomyces cerevisiae* growth and biofuel production. *Green Chemistry*, 13(10), 2743-2749.

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

Paul, S. K., & Chakraborty, S. (2018). Microwave-assisted ionic liquid-mediated rapid catalytic conversion of non-edible lignocellulosic Sunn hemp fibres to biofuels. *Bioresource Technology*, 253, 85–93.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.010>

Parveen, K., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P., 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 3713–3729.

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.

Periyasamy, S., Isabel, J.B., Kavitha, S., Karthik, V., Mohamed, B.A., Gizaw, D.G., Sivashanmugam, P., Aminabhavi, T.M. (2022). Recent advances in consolidated bioprocessing for conversion of lignocellulosic biomass into bioethanol-a review. *Chem.Eng. J.*, 139783.

Poy, H., Valles, A., Lladosa, E., Gabaldón, C., Loras, S. (2023). Selection of protic ionic liquids for the improved production of butanol from rice Straw. *Fuel*; 333,1-11.

Putro, J. N., Soetaredjo, F. E., Lin, S.-Y., Ju, Y.-H., & Ismadji, S. (2016). ChemInform abstract: Pretreatment and conversion of lignocellulose biomass into valuable chemicals. *ChemInform*, 47(27).

- 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>
- Reddy, A. V. B., Shah, M. U. H., Ahmad, A., & Moniruzzaman, M. (2022). Introduction to ionic liquids and their environment-friendly applications. *En Ionic Liquid-Based Technologies for Environmental Sustainability* (pp. 1–15). Elsevier.
- Roy, S., & Chundawat, S. P. (2022). Ionic Liquid–based pretreatment of lignocellulosic biomass for bioconversion: A critical review. *BioEnergy Research*, 16(1), 263–278. <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10425-1>
- 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>
- Sarwer, A., Hamed, S.M., Osman, A.I., Jamil, F., Al-Muhtaseb, A.H., Alhajeri, N.S., Rooney, D.W. (2022). Algal biomass valorization for biofuel production and carbon sequestration: a review. *Environ. Chem. Lett.* 1–55.
- Shah, T. A., & Ullah, R. (2019). Pretreatment of wheat straw with ligninolytic fungi for increased biogas productivity. *International Journal of Environmental Science and Technology: IJEST*, 16(11), 7497–7508. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02277-8>
- Siankevich, S., Fei, Z., Scopelliti, R., Laurenczy, G., Katsyuba, S., Yan, N., & Dyson, P. J. (2014). Enhanced conversion of carbohydrates to the platform chemical 5-hydroxymethylfurfural using designer ionic liquids. *ChemSusChem*, 7(6), 1647–1654. <https://doi.org/10.1002/cssc.201301368>
- Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresource Technology*, 199, 76-82.
- Singh, A., Das, R., Upadhye, V., Rami, E. (2022). Microalgal biomass as a promising feedstock for the production of biohydrogen: a comprehensive

review. *Organ. Waste Biohydrogen*, 251–270.

Tu WC, Hallett JP, (2019). Recent advances in the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Curr Op Green & Sustain Chem* 27: 11-17, DOI: 10.1016/j.cogsc.2019.07.004

Usmani, Z., Sharma, M., Gupta, P., Karpichev, Y., Gathergood, N., Bhat, R., & Gupta, V. K. (2020). Ionic liquid based pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced bioconversion. *Bioresource Technology*, 304(123003), 123003. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123003>

Vaithyanathan, V.K., Goyette, B. y Rajagopal, R. (2023). A critical review of the transformation of biomass into commodity chemicals: Prominence of pretreatments. *Environmental Challenges*, 11: 100700.

Vaithyanathan, V., Cabana, H., n.d. Integrated biotechnology management of biosolids: sustainable ways to produce value-added products. *Front. Water* 133.

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>

Vasanth Kumar Vaithyanathan, Bernard Goyette, Rajinikanth Rajagopal. (2023). A critical review of the transformation of biomass into commodity chemicals: Prominence of pretreatments. *Environmental Challenges*, 11,100700. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2023.100700>.

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>

- Woiciechowski, A., Dalmás, 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>
- Xiaoqi Lin, Kaisen Jiang, Xuebin Liu, Dezhi Han, Qinqin Zhang. (2022). Review on development of ionic liquids in lignocellulosic biomass refining. *Journal of Molecular Liquids*, 359, 119326. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119326>.
- Yang, Z., & Chen, Q. (2023). Enzymatic preparation and characterization of honey pomelo peel cellulose and its cellulose nanofibers. *Industrial Crops and Products*, 206(117655), 117655. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117655>
- Yapo, B., Besson, V., Koukoba, 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
- 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>
- Zabed, H.M., Akter, S., Yun, J., Zhang, G., Awad, F.N., Qi, X., Sahu, J. (2019). Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 105, 105-128.
- Zhang, Y., Ding, Z., Shahadat Hossain, M., Maurya, R., Yang, Y., Singh, V., Kumar, D., Salama, E.-S., Sun, X., Sindhu, R., Binod, P., Zhang, Z., & Kumar Awasthi, M. (2023). Recent advances in lignocellulosic and algal biomass pretreatment and its biorefinery approaches for biochemicals and bioenergy conversion. *Bioresource Technology*, 367(128281), 128281. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128281>
- Zhao, L., Sun, Z.-F., Zhang, C.-C., Nan, J., Ren, N.-Q., Lee, D.-J., & Chen, C. (2022). Advances in pretreatment of lignocellulosic biomass for bioenergy

production: Challenges and perspectives. *Bioresource Technology*, 343(126123), 126123.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126123>

Zhuang, X., Wang, W., Yu, Q., Qi, W., Wang, Q., Tan, X., Zhou, G., Yuan, Z. (2016). Liquid hot water pre-treatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. *Bioresource Technology*, 199, 68–75.

3. DESARROLLO Y APLICACIÓN DE METODOLOGÍAS VERDES PARA PRETRATAMIENTO DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA DE CÁSCARA DE CACAO.

3.1 Introducción

La biomasa lignocelulósica (BLC) es un recurso renovable y abundante en la tierra que presenta potencial para transformarse en productos químicos y biocombustibles de alto valor agregado, con perspectivas a ser uno de los sustitutos a las fuentes de energía tradicionales basadas en recursos fósiles. Anualmente, se estima una producción a nivel mundial de 200 mil millones de toneladas, de las cuales sólo el 3% se utiliza en la industria de la celulosa y el resto se considera material de desecho (A.V.S.L Sai Bharadwaj et al., 2023). La biomasa lignocelulósica se compone principalmente de biopolímeros como la celulosa (30-60%), hemicelulosa (14-40%) y lignina (7-25%) (Okolie et al., 2021; Bhatia et al., 2019;). Por lo que, la complejidad de estos principales constituyentes, su estructura heterogénea, la cristalinidad de la celulosa y el grado de lignificación son los factores responsables de la recalcitrancia de la BLC haciéndola resistente a la degradación biológica y química. Para disminuir la recalcitrancia del material, es necesario aplicar procesos de pretratamiento que faciliten su digestibilidad ya sea química o enzimática.

Durante el proceso de pretratamiento, la BLC sufre una especie de ruptura en la cristalinidad de la celulosa en conjunto con un grado de despolimerización, de la hemicelulosa y la rotura o pérdida eventual de la lignina, disminuyendo la estructura recalcitrante de la lignocelulosa (Chen et al., 2017). El pretratamiento es un paso costoso pero fundamental para mejorar la accesibilidad y digestibilidad del material lignocelulósico. Los estudios más recientes sobre pretratamientos se están enfocando en reducir el consumo de reactivos químicos, los costos y la demanda de energía, es decir, en tratar de aplicar metodologías verdes (Abraham et al., 2020). En el contexto de pretratamientos, los líquidos iónicos (LI's) emergen como una nueva clase de “disolventes verdes”, candidatos

a sustituir los disolventes orgánicos volátiles tradicionales debido a sus propiedades ecológicas, tales como la baja presión de vapor y la no inflamabilidad, además de que su aplicación no forma productos químicos peligrosos y a que es posible una recuperación de hasta aproximadamente el 100% del LI empleado (Brandt-Talbot et al., 2017), además se consideran solventes de diseño pues se pueden sintetizar o modificar en función de su aplicabilidad específica.

La cáscara de la mazorca de cacao (CMC) es una materia prima importante de material lignocelulósico poco estudiado. Esta, es el principal subproducto que se obtiene en la industria del chocolate y representa el 70-75% del peso de la fruta fresca de cacao (Outtara et al., 2021; Lu, et al., 2018; Pérez et al., 2015). Además, se sabe que, por cada tonelada de semillas obtenidas, se generan 10 toneladas de CMC, las cuales son poco o nulumamente aprovechadas, causando impactos, económicos, sociales y ambientales negativos, por lo cual es de suma importancia desarrollar metodologías que permitan su aprovechamiento.

Es por ello, que el presente trabajo tuvo por objetivo implementar el uso de líquidos iónicos asistido por calentamiento en microondas como metodologías verdes para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica de la cascara de cacao, para así, favorecer la obtención y liberación de los principales biopolímeros que componen al material lignocelulósico de este subproducto como lo son la celulosa, la hemicelulosa y la lignina para una mayor digestibilidad ya sea química o enzimática que permita obtener compuestos de alto valor agregado de un modo más eficaz y sostenible.

3.2 Materiales y Métodos

Los materiales y métodos empleados para el presente estudio se mencionan a continuación.

3.2.1 Material vegetal

Cáscaras de cacao frescas (*Theobroma cacao* L.) var. Carmelo se colectaron en,

en el estado de Tabasco, México, municipio de Cunduacán. Las cáscaras se analizaron en instalaciones de la Universidad Autónoma Chapingo, principalmente en el laboratorio de investigación productos naturales, en donde se procedió a retirarles todo material ajeno a estas (semillas, mucilago u otros). Posteriormente, se secaron por exposición indirecta al sol, a temperatura ambiente durante 2 semanas y media y una vez secas, se procedió a moler las cáscaras en un molino manual para la reducción del tamaño de partícula y se pasaron por un juego de tamices ASTM de mallas No. 45, 60 y 80 para la obtención de tamaños de partícula de 355, 250 y 180 μm respectivamente, con estas muestras se procedió a llevar a cabo todos los análisis y pretratamientos.

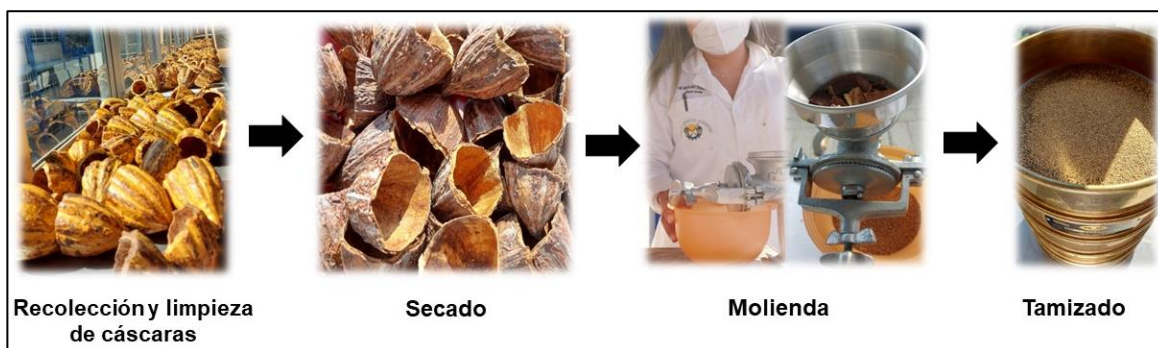


Figura 9. Obtención y preparación de muestras para su análisis.

3.2.2 Equipos y reactivos

Los equipos empleados fueron: equipo de extracción Soxhlet, horno de microondas (CEM, mod. Discover system, EE.UU., Matthews), estufa de secado, balanza analítica, Rota-evaporador (Büchi® Rotavapor R-300, Suiza), infrarrojo (ATR Agilent Cary 630 FTIR, Agilent, EE UU.), microscopio electrónico de barrido (QUANTA™ 450 FEG). Además de algunos reactivos y solventes como: H_2SO_4 , CH_3COOH , NaClO_2 , NaOH , H_2O destilada y desionizada, hexano, diclorometano, metanol, cloruro de 1-butil-3-metilimidazol ([Bmim] Cl), 1-butil- Tetrafluoroborato de 3-metilimidazol ([Bmim] $[\text{BF}_4]$), 1-etil-Tetrafluoroborato de 3-metilimidazol ([Emim] $[\text{BF}_4]$), 1-Hexyl-cloruro de 3-metilimidazol (HMIM). Todos los reactivos

y solventes empleados fueron grado reactivo, adquiridos en Sigma-Aldrich (EE. UU.).

3.2.3 Caracterización del material vegetal: Determinación de extraíbles

Las muestras de cáscara de cacao se prepararon de acuerdo con las normas TAPPI T264 cm-97, T257. Para la determinación de extraíbles, se empleó la norma T204 cm-97, se utilizó como disolventes hexano, diclorometano y metanol. Este procedimiento consistió en tomar una muestra de 10 g (base seca, por triplicado, por cada tamaño de partícula empleado), la cual se introdujo en un dedal de extracción de celulosa, en equipo Soxhlet con 150 ml de hexano durante 4 horas de reflujo, luego se repitió el mismo proceso en 150 ml de diclorometano y finalmente en 150 ml de metanol durante 5 horas. Al término de cada proceso de extracción con cada uno de los disolventes, la muestra sólida se secó hasta peso constante, y el disolvente con los extraíbles se eliminó en un evaporador rotatorio (Büchi® Rotavapor R-300, Suiza). La cantidad de extractos se calculó como la relación en porcentaje de los pesos anhidros del residuo de cada disolvente menos el blanco entre la muestra inicial multiplicados por 100. Con esta muestra exenta de extraíbles, fue posible determinar las cantidades de lignina, celulosa y holocelulosa.

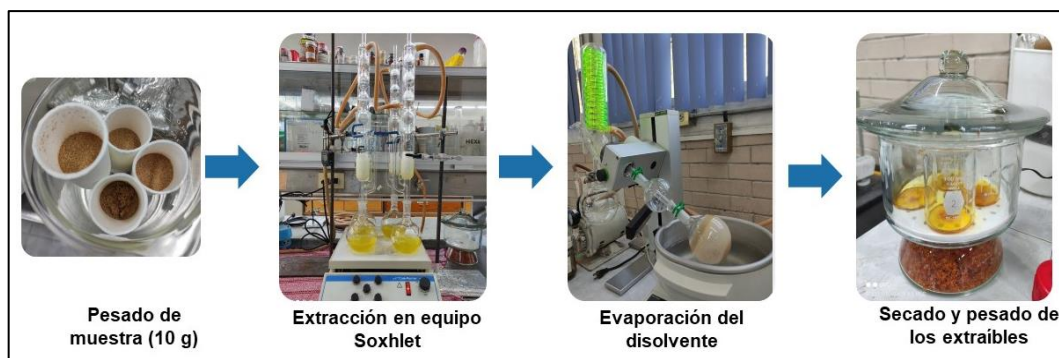


Figura 10. Metodología para la determinación de extraíbles en CPH, de acuerdo a la Norma T-204cm-97

3.2.4 Caracterización del material lignocelulósico: Cuantificación de lignina insoluble en ácido (Lignina Klason)

La determinación de lignina se llevo acabo con base a la norma TAPPI 222 om-

02. La determinación se basa en el método Klason. Para la determinación se colocó en un baño de agua a 20°C, 1 g de muestra seca libre de extraíbles en un vaso de precipitado de 100 ml, al que se le añadió 15 ml de H₂SO₄ al 72%, la muestra se colocó en agitación durante 2 h, al término de este tiempo se detuvo la agitación de la muestra, posteriormente se agregó 30 ml de H₂O destilada, la mezcla se transfirió a un matraz bola de 1000 ml, se le agregó 545 ml más de H₂O destilada hasta alcanzar una concentración del 3% del H₂SO₄, esta muestra se colocó en ebullición con reflujo durante 4 horas, posteriormente se filtró al vacío en crisol Gooch de 50 ml porosidad ASTM 40-60 C y finalmente se secó al horno a 105°C hasta peso constante. La lignina insoluble en ácido se determinó en porcentaje como el peso del residuo multiplicado por 100 entre la muestra libre de extractos. Por cada tamaño de partícula de cáscara molida se realizaron triplicados. Los resultados se expresaron en porcentaje en base seca.

3.2.5 Cuantificación de Holocelulosa

La determinación de holocelulosa se realizó con base en la norma ASTM D1104, llamado técnica de cloración, que define a la holocelulosa como la parte de material vegetal insoluble en agua carbohidratos insolubles en agua. Para la determinación se pesaron 2.5 g de cáscara libre de extraíbles, los cuales se colocaron en un matraz Erlenmeyer, mas 80 mL de agua caliente, 0.5 mL de CH₃COOH y 1.0 g NaClO₂. El el recipiente con la mezcla se tapó y se colocó en baño de agua a 75 ± 5 °C durante una hora, con agitación semiconstante. Posteriormente, se añadió nuevamente 0.5 ml de ácido acético y 1.0 g de clorito de sodio. El procedimiento se hizo cada hora por un tiempo de cuatro horas, al finalizar, el matraz se enfrió en un baño con hielo. Al enfriarse la mezcla, se filtraron al vacío los sólidos usando un papel filtro previamente pesado. Al residuo sólido se le agrego agua destilada (lavar) hasta la eliminación del color amarillento y los vapores de compuestos de cloro. Finalmente, la muestra se secó a 102 ± 3°C en estufa, hasta lograr un peso constante, se colocó en un desecador y se pesó. Las determinaciones se realizaron tres veces para cada tamaño de

partícula. Los resultados se expresaron en porcentaje en base seca.

3.2.6 Cuantificación de Celulosa

La celulosa se determinó de acuerdo a la norma TAPPI T 203 cm-99, en donde se partió de una muestra de 2 g de holocelulosa, se colocó en un vaso de precipitado de 250 ml, el cual se llevó a un baño de agua de 20°C, se agregaron 10 ml de NaOH al 17.5% y 15 ml más en intervalos de 5 ml cada 5 minutos, para un total de 25 ml de NaOH 17.5% y se dejó en reposo durante 30 minutos, al término de 45 minutos se añadieron 33 ml H₂O destilada y se dejó en reposo durante 1 h más, posteriormente se pasó a filtración en crisol Gooch para lavado de flujo lento con 100 ml de NaOH al 8.3%, 100 ml de H₂O destilada, 15 ml de CH₃COOH y finalmente lavado con H₂O destilada hasta pH neutro. Se filtró al vacío de acuerdo a la norma. El contenido de celulosa se determinó una vez seco el residuo en horno hasta peso constante, el resultado expresado en porcentaje es la relación del peso anhidro del residuo entre el peso anhidro de la holocelulosa multiplicado por 100.

3.2.7 Cuantificación de cenizas

Las cenizas se determinaron por triplicado por tamaño de partícula empleado. La determinación se realizó con 4 gramos de muestra, la cual se colocó en un crisol de porcelana seco y de peso conocido, el crisol se introdujo en una mufla (Barnstead/Thermolyne Benchtop Muffle Furnaces, Type 47900) y se calentó hasta llegar a 575°C durante dos horas, donde se incineró sin producir flama, posterior a esto, se sacó, enfrió en desecador y pesó, se regresó la muestra a la mufla con las mismas condiciones de temperatura y se dejó una hora más para llevar a peso constante. El cálculo se realizó con el peso de la ceniza multiplicado por 100 entre el peso inicial de la muestra, para el reporte de resultados en porcentaje (base seca).

3.2.8 Pretratamientos con líquidos iónicos asistido en microondas

Para cada tamaño de partícula empleado se ocuparon 100 mg de cascará de cacao, se introdujeron en un tubo reactor para microondas (CEM, mod. Discover system, EE.UU., Matthews) equipado con una barra magnética, la muestra se mezcló con 0.2mL del respectivo líquido iónico a probar: el 1-butyl-Tetrafluoroborato de 3-metilimidazolio ([Bmim] [BF₄]) y el 1-hexyl- cloruro de 3-metilimidazolio ([HMIM][Cl]). Se procedió a irradiar las muestras con temperaturas desde 100, 150, 180 y 200 grados centígrados, con tiempos de trabajo de 5, 10 y 15 minutos respectivamente para estudiar el efecto de la digestibilidad de la biomasa lignocelulósica de CMC. Después de cada tratamiento, la mezcla se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, posteriormente, las muestras tratadas se filtraron realizando lavados con 15 mL de diclorometano. La fase solida se recuperó en frascos viales, los cuales se secaron junto con la muestra recuperada a 100°C durante 4horas, posteriormente se secaron y almacenaron en desecadores hasta sus posteriores análisis. Por otra parte, la fase líquida se concentró en rotavapor Büchi® con la finalidad de recuperar ambos disolventes tanto el diclorometano que se utilizó para los lavados, así como el líquido iónico empleado para su posterior reutilización. Con los pesos tanto del material sólido como líquido se realizaron los cálculos del porcentaje de recuperación de ambas fases.

Cuadro 5. Diseño experimental de los pretratamientos aplicados

Tamaño de Malla	Temperaturas y tiempos de reacción											
	100°			150°C			180°			200°		
45 (355µm)	5'	10'	15'	5'	10'	15'	5'	10'	15'	5'	10'	15'
60 (250µm)												
80 (180µm)												

Nota: las condiciones experimentales aplicaron para cada liquido iónico probado.

3.2.9 Caracterización estructural por FTIR-ATR

Después de los pretratamientos las muestras se caracterizaron estructuralmente para observar los cambios en los grupos funcionales mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) utilizando un espectrómetro ATR-FTIR (espectrómetro ATR Agilent Cary 630 FTIR, Agilent, EE UU.). Todas las muestras se analizaron en el rango de 800-4000cm⁻¹ con 128 scans y una resolución de 0.16. Adicionalmente las muestras sin pretratamiento, pero libres de extraíbles fueron caracterizadas también para contar con un patrón de referencia para cada tamaño de partícula empleado.

3.2.10 Caracterización estructural por microscopia electrónica de barrido (SEM)

La morfología de la superficie de las cascaras de cacao después del pretratamiento se observó mediante un Microscopio electrónico de barrido por emisión de campo (FEI QUANTA™ 450 FEG) operando a un voltaje de aceleración de 1-5 kV y un aumento de 50X y 500X. Previo a su análisis las muestras fueron secadas a punto crítico en una estufa de secado y se recubrieron con oro-paladio antes del análisis SEM.

3.2.11 Análisis estadístico

El reporte del contenido de extraíbles totales, celulosa, lignina, holocelulosa, y cenizas de las muestras sin pretratamientos, se calculó el promedio y la desviación estándar de las 3 repeticiones por muestra (tamaño de partícula), además se llevo a cabo el análisis de varianza (diseño completamente al azar por triplicado) en busqueda de identificar diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los tamaños de partícula empleados, además se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Tukey.

En el caso del porcentaje de recuperación de sólidos totales después de los

pretratamientos, únicamente se calculó el promedio de las 3 repeticiones y con estos datos se procedió a analizarlos mediante un diseño factorial 3^k para establecer diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$), entre los 3 principales factores a evaluar: uno el tamaño de partícula, dos el tiempo y temperatura de reacción y tres, los líquidos iónicos empleados. Todos los datos se analizaron usando el programa estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EE. UU).

3.3 Resultados y discusión

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el presente estudio, así como su respectiva discusión en cada apartado.

3.3.1 Cuantificación de extraíbles y material lignocelulósico de la cáscara de cacao

Los valores de la composición del BLC y extraíbles de la CMC, por tamaño de partícula, se muestran en la Tabla 4, en donde se puede observar que la composición química de las mismas presento un contenido importante y mayoritario de celulosa con un porcentaje aproximado de 29%, seguido de la lignina con un porcentaje de ~25% y finalmente de hemicelulosa con un porcentaje ~ 18%, para los cuales no existió diferencias significativas entre tamaños de partícula. Estos tres porcentajes obtenidos son de particular interés, ya que juntos conforman más del 50% de los constituyentes químicos de la cáscara de mazorca de cacao, lo que nos indica que en efecto ésta, es una fuente importante de material lignocelulósico que puede ser aprovechada para la obtención de bioenergía y otros compuestos bajo un concepto de biorrefinería (Villamizar et al., 2017; Valladares-Diestra, 2022).

Cuadro 6. Cuantificación del material lignocelulósico de tres tamaños de partícula de la cáscara de cacao, variedad Carmelo.

Malla/Tamaño de partícula	Extraíbles (%)	Lignina (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Cenizas (%)
45 (355µm)	22.01 ± 1.19	25.40 ± 0.51	28.5 ± 1.12	17.45 ± 1.19	6.31 ± 0.40 ^a
60 (250µm)	21.35 ± 1.36	25.31 ± 0.56	29.12 ± 1.03	18.01 ± 1.04	6.25 ± 0.10 ^a
80 (180µm)	21.07 ± 1.28	25.67 ± 0.76	29.8 ± 1.05	17.86 ± 1.23	5.20 ± 0.10 ^b

Promedios (n=3) ± desviación estándar. Ausencia de letras significa que no existe diferencia significativa; letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa. (Tukey, $p < 0.05$)

En lo que respecta al contenido de extraíbles totales, este fue de aproximadamente el 22%, para el cual tampoco existió diferencia significativa entre tamaños de partícula analizados. Este contenido importante y nada despreciable de extraíbles, se asocia al contenido de mezclas de compuestos liposolubles, carbohidratos e hidrocarburos de bajo peso molecular, algunos compuestos fenólicos y otros compuestos hidrosolubles (Ofosua et al., 2016; Campos-Vega et al., 2018), compuestos que de igual manera pueden emplearse para la fabricación de productos de interés o bien para extraerlos y agregarlos a otras fuentes alimenticias dándoles así un valor agregado. En el caso de cenizas, si existió diferencias significativas, encontrando un porcentaje menor (~5%) en el caso de la malla 80, lo cual se asocia a la consecuente reducción del tamaño de partícula, en la que probablemente haya un tipo de pérdida de estos componentes minerales asociados al contenido de cenizas. Es importante mencionar que los porcentajes de cenizas encontrados son altos y de acuerdo con estudios previos se destaca el contenido de minerales como el calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, sodio y zinc (Vázquez, et al., 2019) lo que podría sugerir su uso en la fortificación de otros alimentos procesados.

Cuadro 7. Composición química (material lignocelulósico) de cáscara de cacao, reportada en 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)
28.25	16.75	24.16	9.07		(Sandesh et al., 2020)
24.4	11.0	26.38	-	10.02	(Vásquez et al., 2019)

En el Cuadro 7 se puede observar la composición química en cuanto al material lignocelulósico y extraíbles de cáscara de cacao reportada en trabajos previos, en esta se puede observar que los porcentajes de celulosa, hemicelulosa, lignina, extraíbles y cenizas obtenidos en el presente estudio entran dentro del rango de porcentajes reportados en la literatura, en algunos casos los porcentajes obtenidos son inferiores e incluso en su mayoría son superiores, estas diferencias se pueden atribuir a una diversidad de factores, entre ellos la variedad de cacao empleada, su madurez, el tipo de suelo del que provenga, las condiciones climáticas así como los métodos empleados en las determinaciones hace que las composiciones reportadas no sean tan homogéneas pero sí semejantes y comparables entre sí.

3.3.2 Análisis de líquido iónico remanente y de sólidos totales recuperados en los pretratamientos.

La evaluación del efecto de los líquidos iónicos sobre el material lignocelulósico de la cáscara de mazorca de cacao, se llevó a cabo inicialmente cuantificando

en el material sólido recuperado en cada pretratamiento. Asociado a lo anterior, fue también necesario evaluar el líquido iónico recuperado después de cada pretratamiento realizado; el líquido remanente que se obtuvo por filtración con CH_2Cl_2 se analizó por comparación de los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN). Se seleccionaron los líquidos remanentes obtenidos de tres experimentos de pretratamientos del material lignocelulósico con el líquido iónico 1-butil- tetrafluoroborato de 3-metilimidazolio [BMIM] BF_4 , en los tres experimentos, se modificó la temperatura de calentamiento (100, 150 y 180°C), (figura 11). El espectro ^1H -RMN, del experimento a 100° C (figura 11-b), muestra de manera general como componente mayoritario el [BMIM] BF_4 , sin embargo, comparado con el espectro de protón del LI's puro (figura 11-a), se observan pequeñas señales que al parecer se duplican, lo anterior se puede asociar a dos posibles fenómenos, uno de ellos podría indicar un ligero grado de descomposición del líquido iónico. A pesar de que hay un pequeño grado de descomposición al aumentar la temperatura a 150 o C y 180 °C, los espectros muestran que no hay descomposición total (figuras 11-c y 11-d). La otra posibilidad, es que dichas señales corresponden a residuos de carbohidratos, o ligninas solubles en el líquido iónico, esta consideración es más lógica, dado que la composición estructural de la BLC, contiene variedad de estas mezclas de compuestos que se liberan en los pretratamientos.

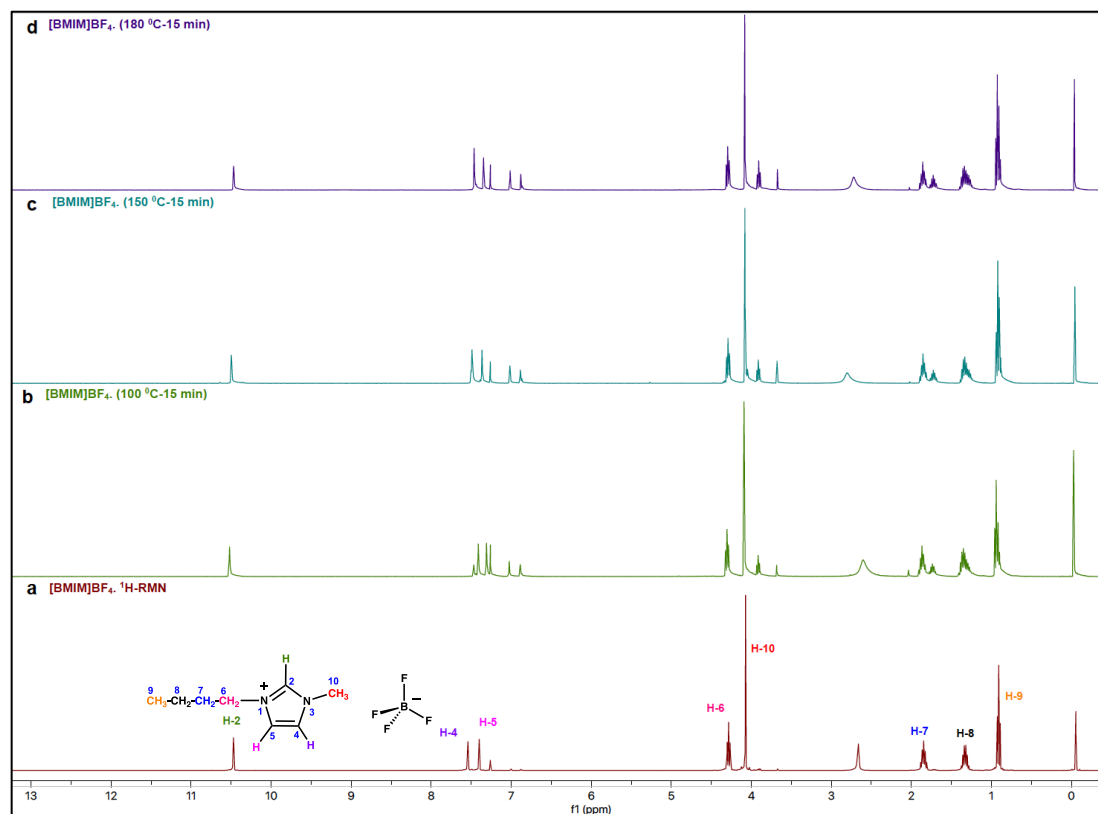


Figura 11. a) Espectro ^1H -RMN de $[\text{BMIM}]\text{BF}_4$ Puro, b) ^1H -RMN de líquido recuperado de pretratamiento a 100o C, c) ^1H -RMN de líquido recuperado de pretratamiento a 150o C, d) ^1H -RMN de líquido recuperado de pretratamiento a 180o C.

A pesar de que el líquido iónico recuperado, contiene en una baja proporción de otros compuestos disueltos en él; este análisis permite verificar que el líquido iónico puede ser reciclado después de los pretratamientos y este aspecto es muy relevante dentro del contexto de una metodología verde. Otro análisis realizado fue la cuantificación de los sólidos recuperados después de los pretratamientos, el enfoque se centra en evaluar principalmente el grado de interacción y solubilización del material lignocelulósico de CM, a cada condición de pretratamiento. Se pretendió establecer cuál es la condición más apropiada para modificar las diferentes composiciones de este material. Inicialmente, el análisis se realizó para los pretratamientos con el líquido iónico $[\text{BMIM}]\text{BF}_4$, los resultados

obtenidos se muestran de manera grafica en la figura 12.

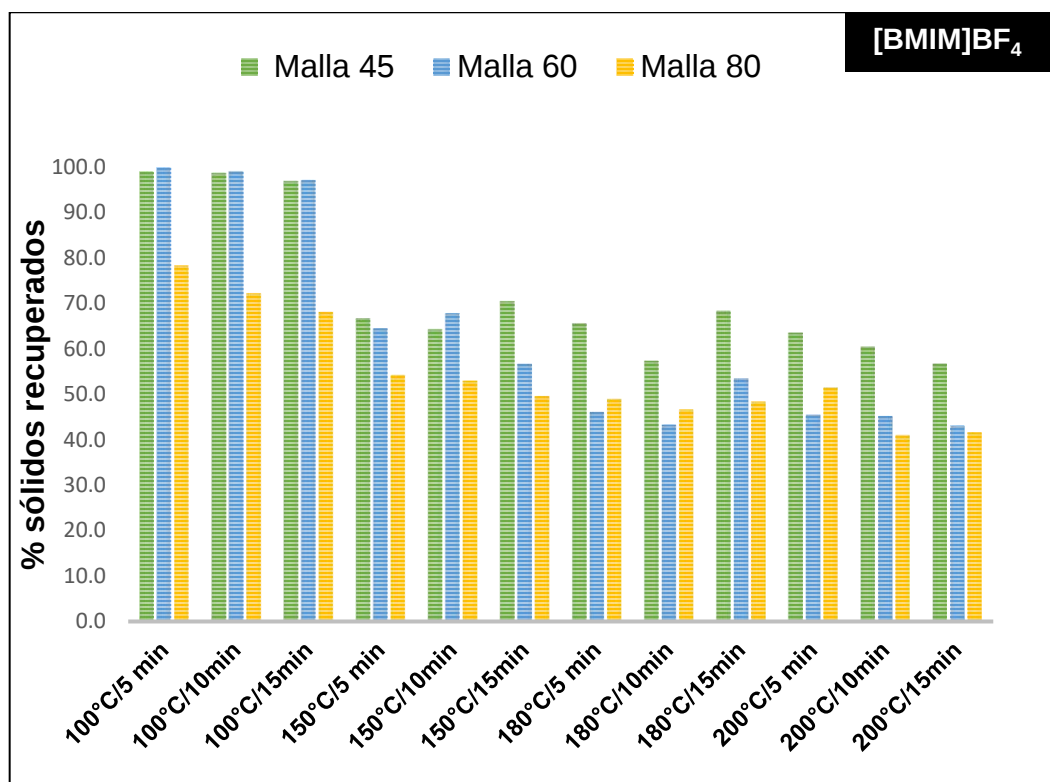


Figura 12. Porcentajes de recuperación de sólidos después de los diferentes pretratamientos con [BMIM]BF₄.

La gráfica muestra un mayor porcentaje de recuperación de sólidos en los experimentos a baja temperatura, sin embargo, a temperaturas de calentamiento a 150 °C, el porcentaje se reduce manteniéndose en un rango constante hasta en los pretratamientos más “severos” que se llevaron a cabo a altas temperaturas y tiempos de reacción (180-200°C/15min) y específicamente para el caso de los tamaños de partícula 250 y 180 μm (mallas 60 y 80 respectivamente). La disminución en el porcentaje de recuperación de sólidos para los pretratamientos con [BMIM]BF₄, se puede asociar a la elevada acidez que presenta éste líquido iónico, debido al catión (imidazolio) y anión (BF₄⁻) que lo conforma y su afinidad por el enlace hidrógeno, pues de acuerdo con los mecanismos de solubilidad de la biomasa lignocelulósica con líquidos iónicos reportados en la literatura (Xiaoqui et al., 2022; Usmani et al., 2020; Jing et al., 2019; Zhang et al, 2017), predomina la formación de un complejo Donado-Aceptor de Electrones (EDA) mediante la

interacción de los átomos de oxígeno e hidrógeno de los hidroxilos de la celulosa y los líquidos iónicos (Figura 13) con base a su acidez y su mayor o menor capacidad de aceptar-donar electrones, se favorece dicha interacción y con ello la deconstrucción de los enlaces celulosa-celulosa dando como resultado una mayor disolución de la biomasa y específicamente, la celulosa (Nis y Laya, 2021; Rabideau et al., 2014; Raj et al.; 2016).

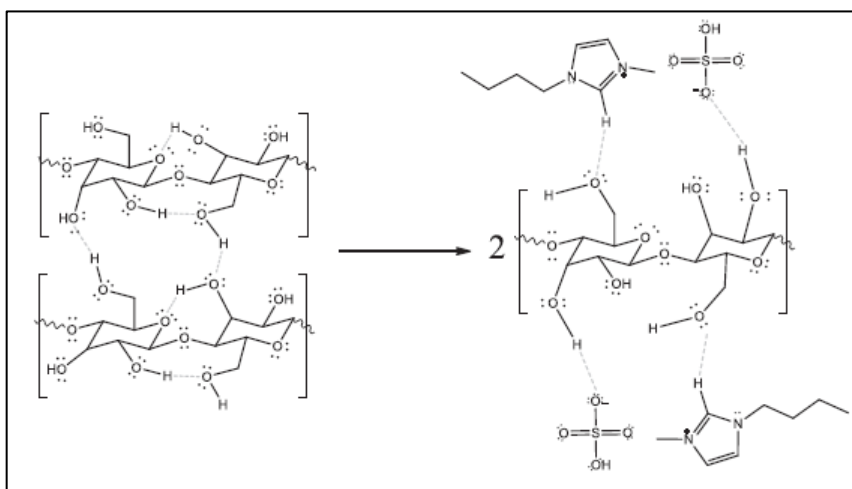


Figura 13. Interacciones donador-aceptor de electrones (EDA) entre grupos alquil imidazolio e iones hidrogen-sulfato con los grupos hidroxilo de la celulosa/hemicelulosa (Fuente: Nis & Kaya, 2021; Matsagar & Dhepe, 2015)

En lo que respecta a los pretratamientos con líquido iónico [HMIM]Cl y los altos grados de recuperación de sólidos obtenidos (figura 14), se asocian a un menor porcentaje de solubilización del material lignocelulósico, pese a que en la literatura se reporta que los cationes imidazolio son de los LI más eficientes en la deconstrucción de la biomasa lignocelulósica (Usmani 2020: Li et al., 2018; Financie et al, 2016; Pérez-pimienta et al., 2016); sin embargo, en este caso la baja la solubilización se asocia al radical hexyl que contiene el catión imidazolio, lo que le confiere un mayor peso molecular, una mayor hidrofobicidad así como un mayor impedimento estérico que físicamente se traduce en una mayor viscosidad y químicamente en la dificultad de la interacción del tipo EDA, antes mencionada.

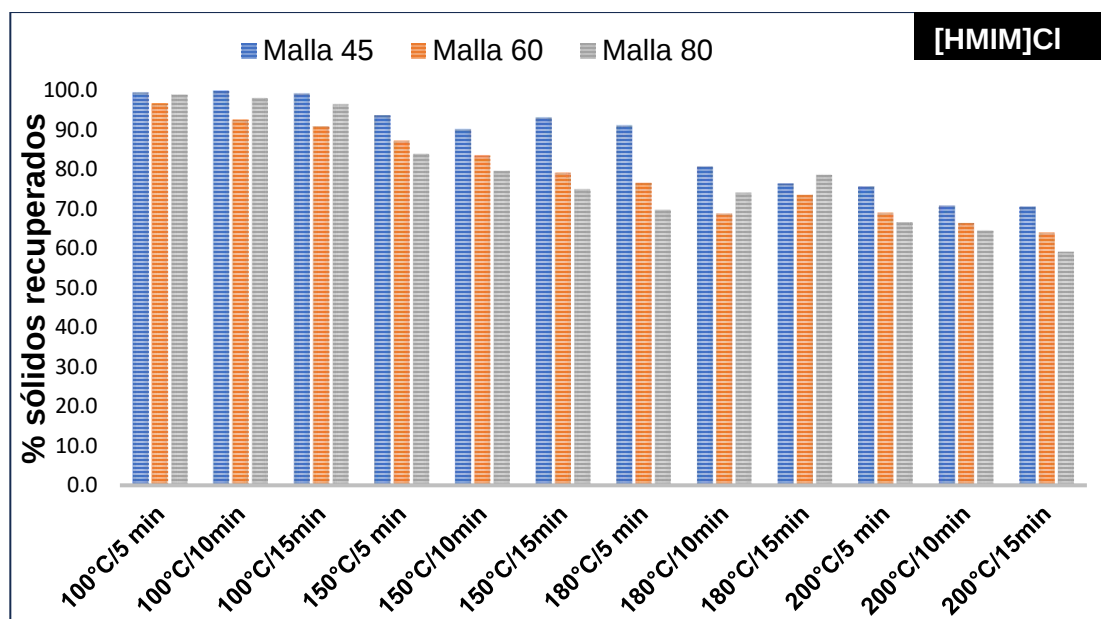


Figura 14. Porcentajes de recuperación de sólidos después de los diferentes pretratamientos con [HMIM]Cl

Finalmente y de acuerdo con el análisis de varianza realizado para los porcentajes de recuperación de sólidos (Anexo 1), se muestra, que en efecto existió diferencia significativa entre al menos un tratamiento, por lo que al realizar el test comparativo de medias (Tukey con $p < 0.05$) se verificó y comprobó que existió diferencias significativas entre tratamientos, es decir, que tanto el tamaño de partícula, los líquidos iónicos empleados así como los tiempos y temperaturas de reacción son parámetros estadísticamente significativos y cruciales en la recuperación de sólidos. Es importante mencionar, que para todas las muestras se obtuvieron menores porcentajes de recuperación de sólidos a medida que aumentó la temperatura y los tiempos de reacción, lo que se asocia a la mayor severidad del pretratamiento. Durante este proceso también se llevó a cabo la recuperación de los líquidos iónicos empleados. Los resultados obtenidos mostraron porcentajes de recuperación del 95-100% en todos los casos, lo cual es de gran importancia puesto que estos pueden volver a ser utilizados, minimizando el impacto ambiental de que presentan los disolventes tradicionales, sugiriendo su uso e implementación en la química verde (Šibalić et al., 2023;

Amini, Valls y Roncero, 2021; Usmani et al., 2020; Asim et al., 2019).

3.3.3 evaluación del Efecto de los pretratamientos en la estructura de la biomasa: *Caracterización estructural por FT-IR*

Se llevó a cabo un análisis por espectroscopía de Infrarrojo medio con un equipo de transformada de Fourier (FT-MIR) del material lignocelulósico de CMC, antes y después de los pretratamientos con LI. Las muestras sólidas, fueron insoluble en disolventes orgánicos o agua; por lo que es un material apropiado para usar la técnica de ATR en la espectroscopía IR y para detectar los estiramientos y vibraciones de grupos funcionales orgánicos .

Cuadro 8. Absorción IR características en el estudio de la BLC (adaptado de Xu & Wang, 2015)

Longitud de onda/cm ⁻¹	Asignación/ grupo Funcional	Biopolímero
874	Enlace glucosídico C-O-H	Hemicelulosa
930	Enlace glucosídico C-O-H	Celulosa, Hemicelulosa
990	Vibración C-O, C=C, C-C-O	Celulosa
1035	Estiramiento C-O, C=C, C-C-O	Celulosa, hemicelulosa y lignina
1160	Vibración asimétrica C-O-C	Celulosa, hemicelulosa
1200	Flexión O-H	Celulosa, hemicelulosa
1215	Estiramiento C-O y C-C	Lignina (madera)
1270	Vibración Aromática	Guayacilo (lignina)
1280	Flexion C-H	Celulosa cristalina
1310	Oscilacion C-H	Celulosa, hemicelulosa
1327	Deformación C-O	Anillo de siringilo (lignina)
1335	Vibración C-H, Flexión O-H en el plano	Celulosa, hemicelulosa
1380	Flexion C-H	Celulosa, hemicelulosa
1425	Deformación C-H en el plano	Lignina (madera)
1440	Flexión O-H en el plano	Celulosa, hemicelulosa y lignina
1465	Deformación C-H	Lignina
1500	Vibración en anillo aromático	Lignina
1595	anillo aromático + estiramiento C=O	Lignina
1682	Estiramiento C=O, (no conjugado)	Hemicelulosa
1730	Estiramiento C=O, cetona, aldehído	Hemicelulosa
1750	Ester libre	Hemicelulosa
2480, 2937	Estiramiento C-H	Hemicelulosa
3421	Estiramiento O-H	Hemicelulosa

Para este análisis se recurre a los datos de la literatura (Xu & Wang, 2015), lo cual una herramienta para asignar los estiramientos y vibraciones características asociadas a las unidades estructurales de los biopolímeros constituyentes de BLC (Cuadro 8).

La complejidad estructural del residuo sólido, no permite distinguir de manera muy resuelta cambios significativos en la matriz lignocelulósica, sin embargo, se señalarán diferencias sutiles basados en los pretratamientos con los dos LI de trabajo. La Figura 15, muestra los distintos espectros determinados para CMC, de tamaño de partícula malla 45, con el líquido iónico [BMIM]BF₄ y [HMIM]Cl, en ellos se observan algunas señales características de los grupos funcionales constituyentes de los polímeros del material lignocelulósico.

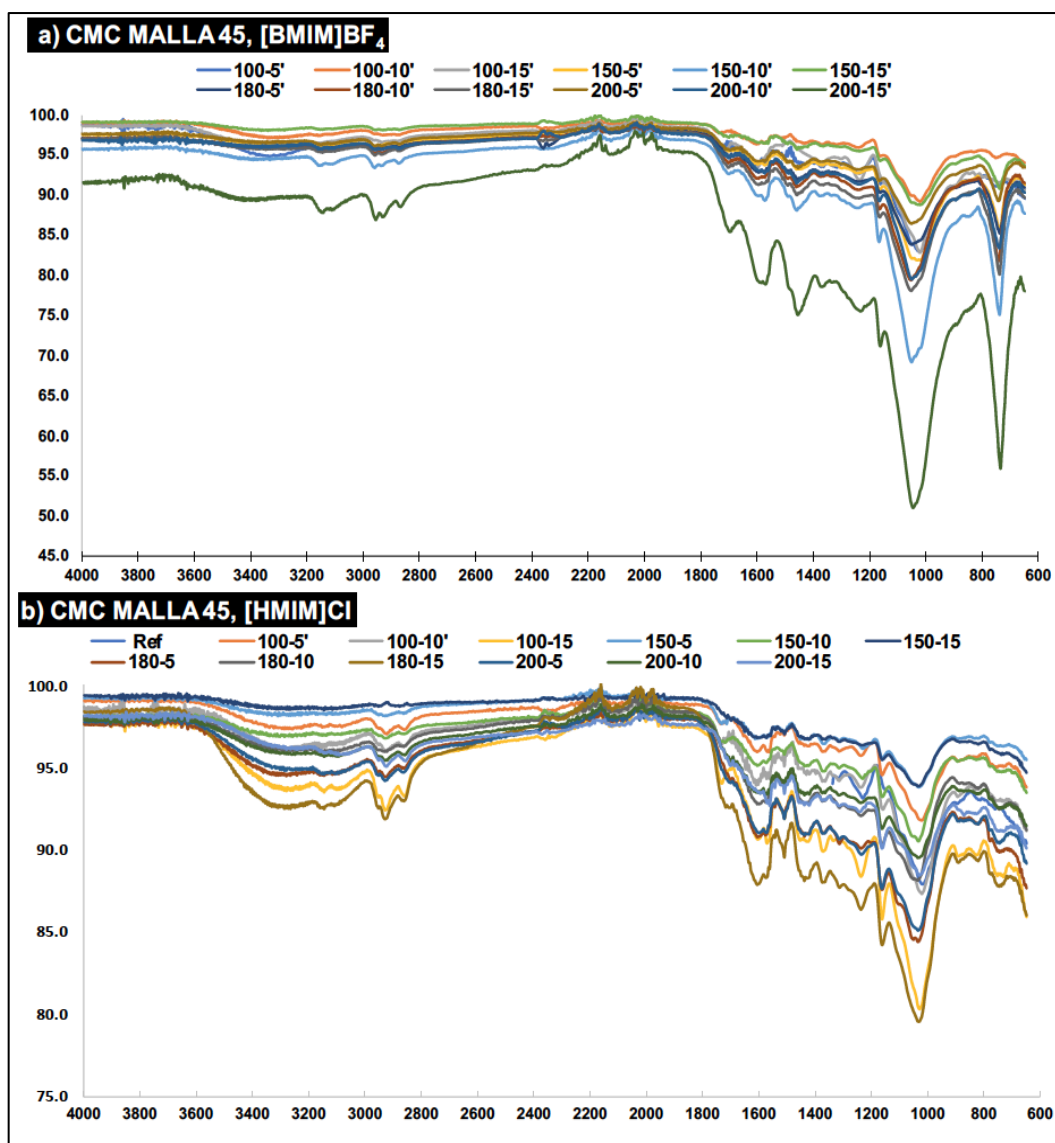


Figura 15. Espectros de IR de los sólidos recuperados en pretratamientos con [BMIM]BF₄ y [HMIM]Cl, a diferentes tiempos y temperaturas para CMC malla 45.

Todos los sólidos recuperados a este tamaño de partícula muestran bandas anchas cercanas a 3400 cm^{-1} ; las cuales son asignadas a la elongación O-H, de OH de fenoles, azúcares y/o, de alcoholes no estructurales R-OH. En el caso del tratamiento con [BMIM]BF₄ estas bandas se presentan menor intensidad lo que contrasta con los espectros para el pretratamiento con [HMIM]Cl, este efecto se puede atribuir a: la pérdida de “puentes de hidrógeno” intermolecular o la

competencia por esos centros de enlace de parte del líquido iónico; es decir si el [BMIM]BF₄ tuvo una mayor interacción con el material lignocelulósico, efectivamente este efecto se ve marcado en las señales anchas del estiramiento O-H. En 2900 y 2800 cm⁻¹, se encuentran las elongaciones correspondientes a el enlace C-H de grupos metilo, metileno, metino, metoxilo y algunos de anillos aromático. Otras señales importantes como la 900 (y 1424 cm⁻¹, están asociadas a celulosa amorfa y cristalina respectivamente (Poy et al., 2023). Después del pretratamiento con [BMIM]BF₄ estas bandas se observó que la celulosa amorfa (900 cm⁻¹) se acentuó más, mientras que en el pretratamiento con [HMIM]Cl la acentuación de dicha banda fue menor. Esto confirmó la mayor solubilización de la fracción de celulosa amorfa de CMC después del pretratamiento con [BMIM]BF₄. El análisis de los espectros de IR, para los tamaños de partícula del material lignocelulósico 60 mallas y 80 mallas (figuras 16 y 17), mostró un patrón de señales similar a los pretratamientos de 45 mallas, por lo que se concluye que el cambio de tamaño de partícula, no fue significativo.

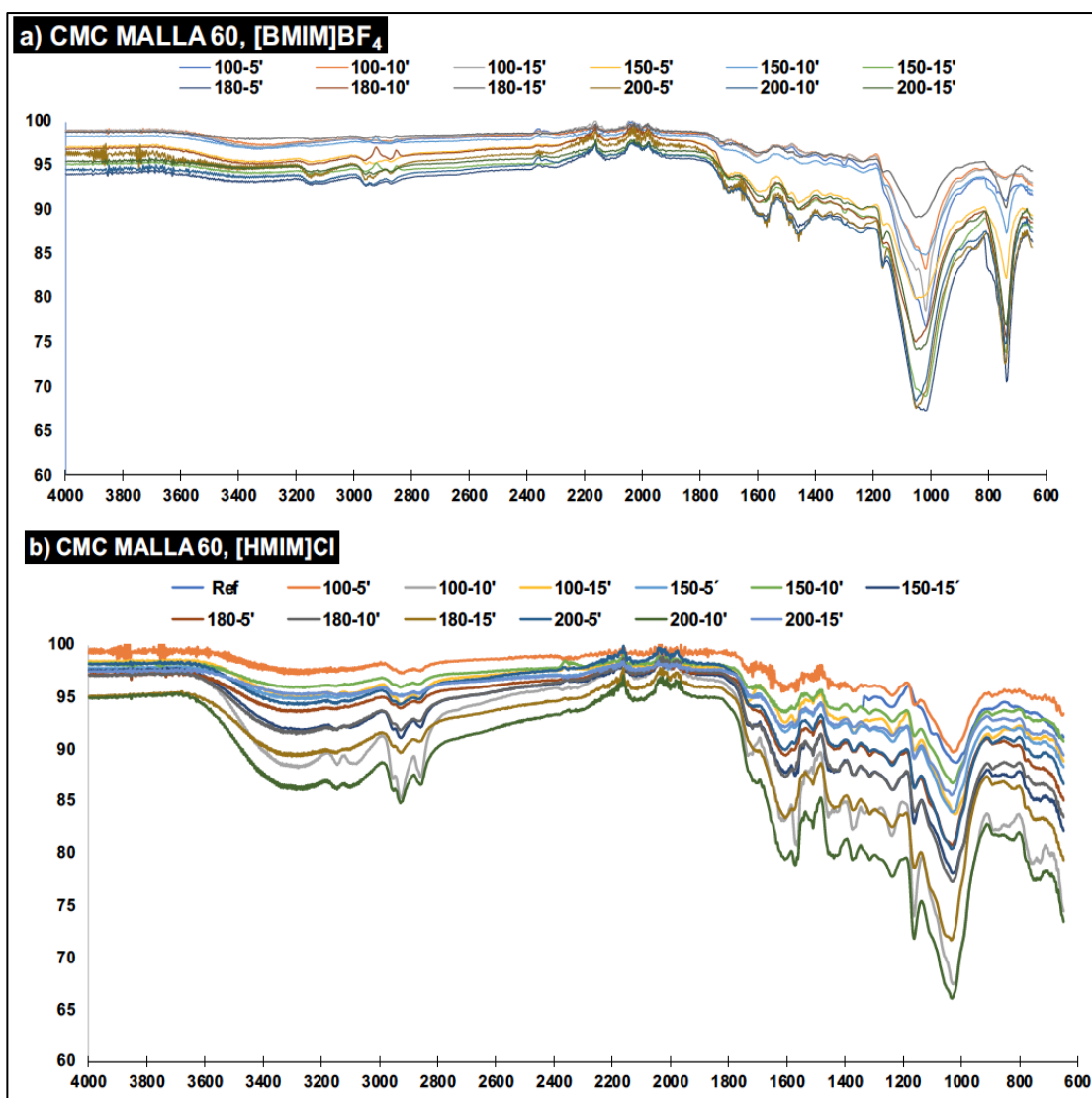


Figura 16. Espectros de IR de los sólidos recuperados en pretratamientos con [BMIM]BF₄ y [HMIM]Cl, a diferentes tiempos y temperaturas para CMC malla 60.

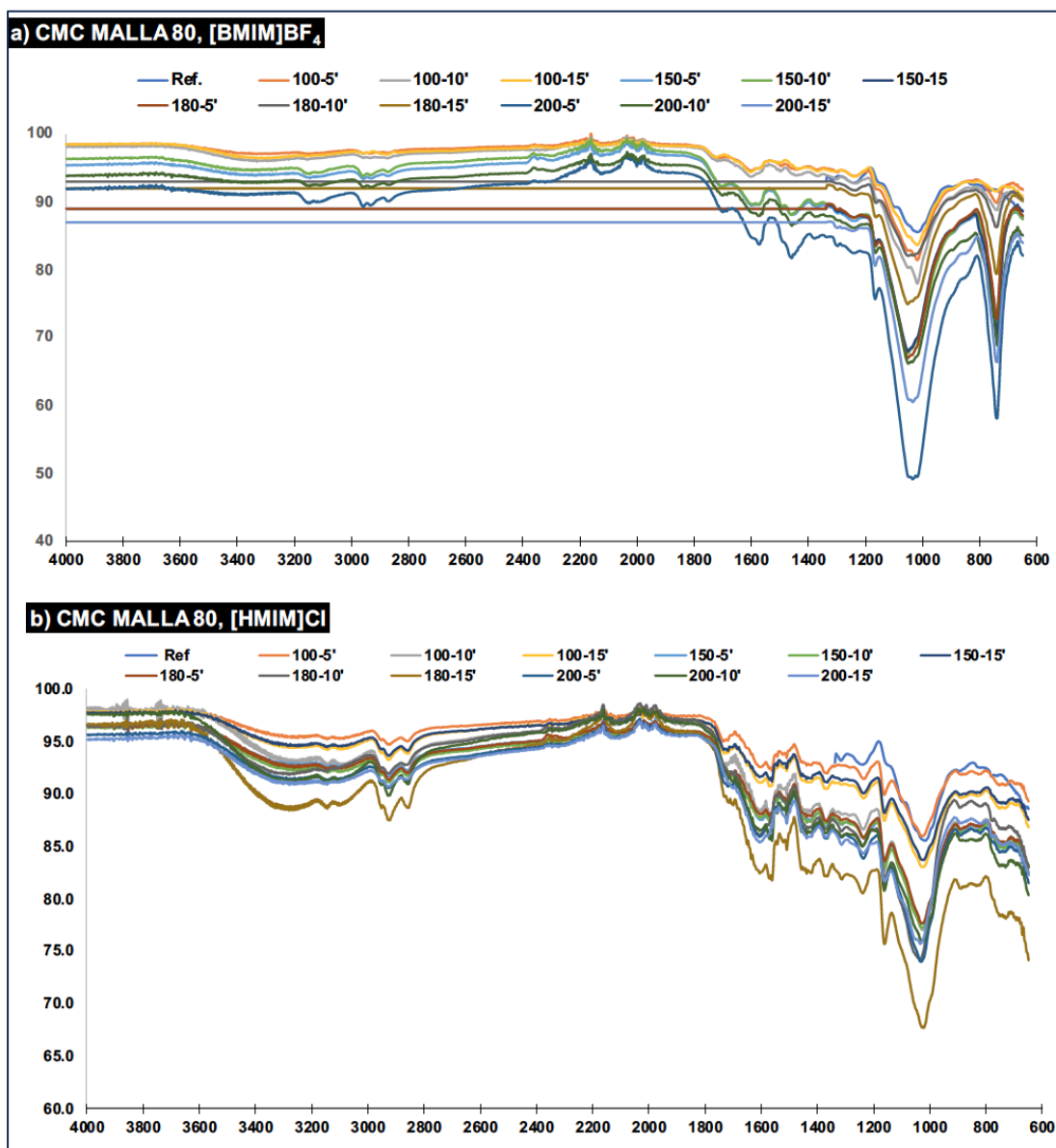


Figura 17. Espectros de IR de los sólidos recuperados en pretratamientos con [BMIM]BF₄ y [HMIM]Cl, a diferentes tiempos y temperaturas para CMC malla 80.

3.3.2.3 Efecto de los pretratamientos en la micro-estructura de la biomasa: *Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM)*

Los cambios morfológicos del material sólido después de los pretratamientos se investigaron mediante análisis SEM. Se seleccionaron algunos experimentos para realizar el análisis de la superficie del material, en los cuales solo se usó el tamaño de partícula de malla 60. En la figura 18, se muestra el material de CMC

sin tratar (figura. 18a), para un aumento de 100 μm , se observó características de una estructura empaquetada y ordenada.

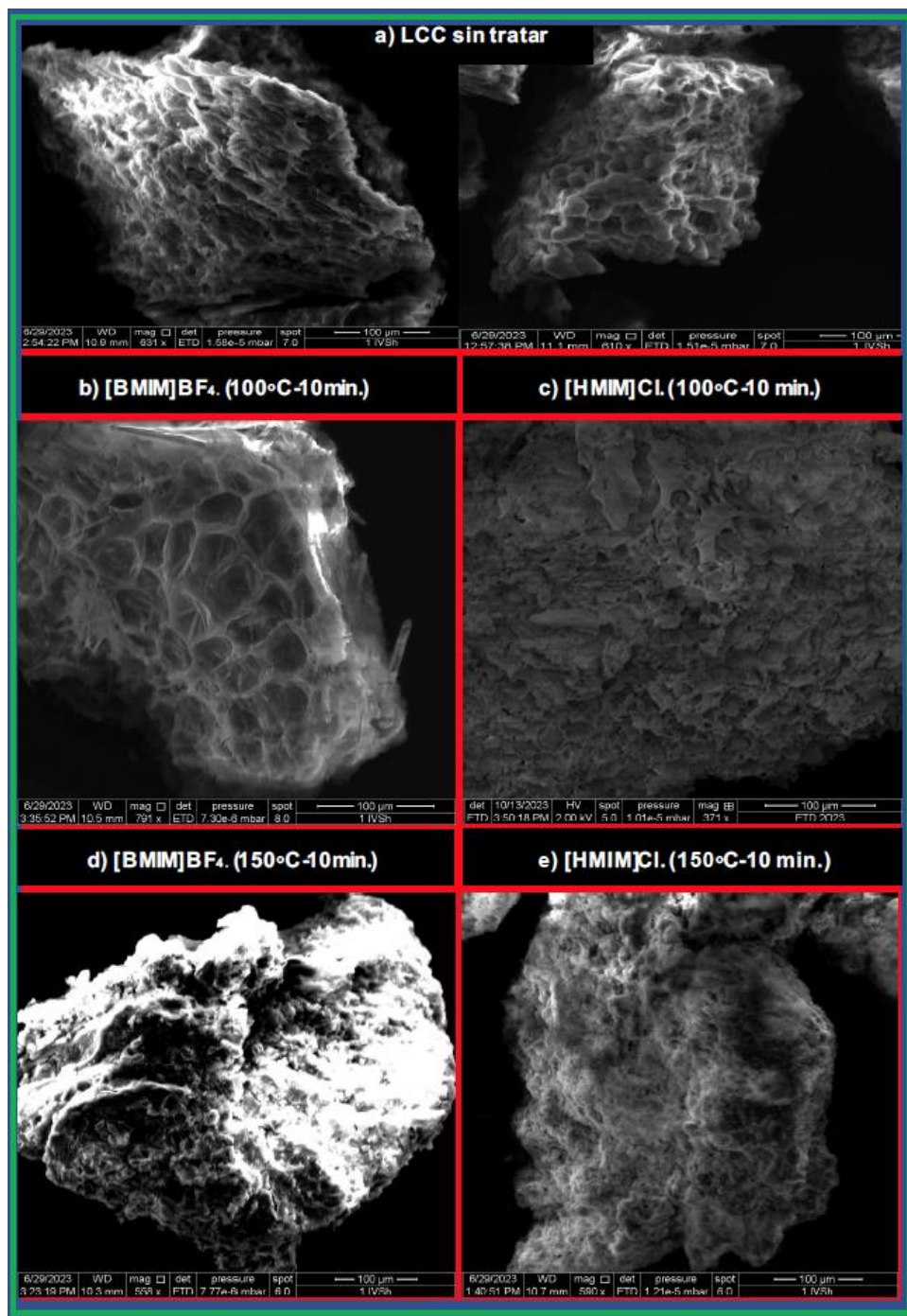


Figura 18. Micrografías SEM de pretratamientos con líquidos iónicos de CMC a 100°C (b y c) y a 150°C (d y e)

Al someter el material a tratamientos con LI $[\text{BMIM}]\text{BF}_4$ y $[\text{HMIM}]\text{Cl}$, en temperaturas de 100°C y tiempo de calentamiento de 10 minutos (figuras 18-b y 18-c), se observó cambio en la morfología, principalmente con el uso de $[\text{BMIM}]\text{BF}_4$, se observa un alto nivel de porosidad que contrasta con la homogeneidad del material pretratado con $[\text{HMIM}]\text{Cl}$.

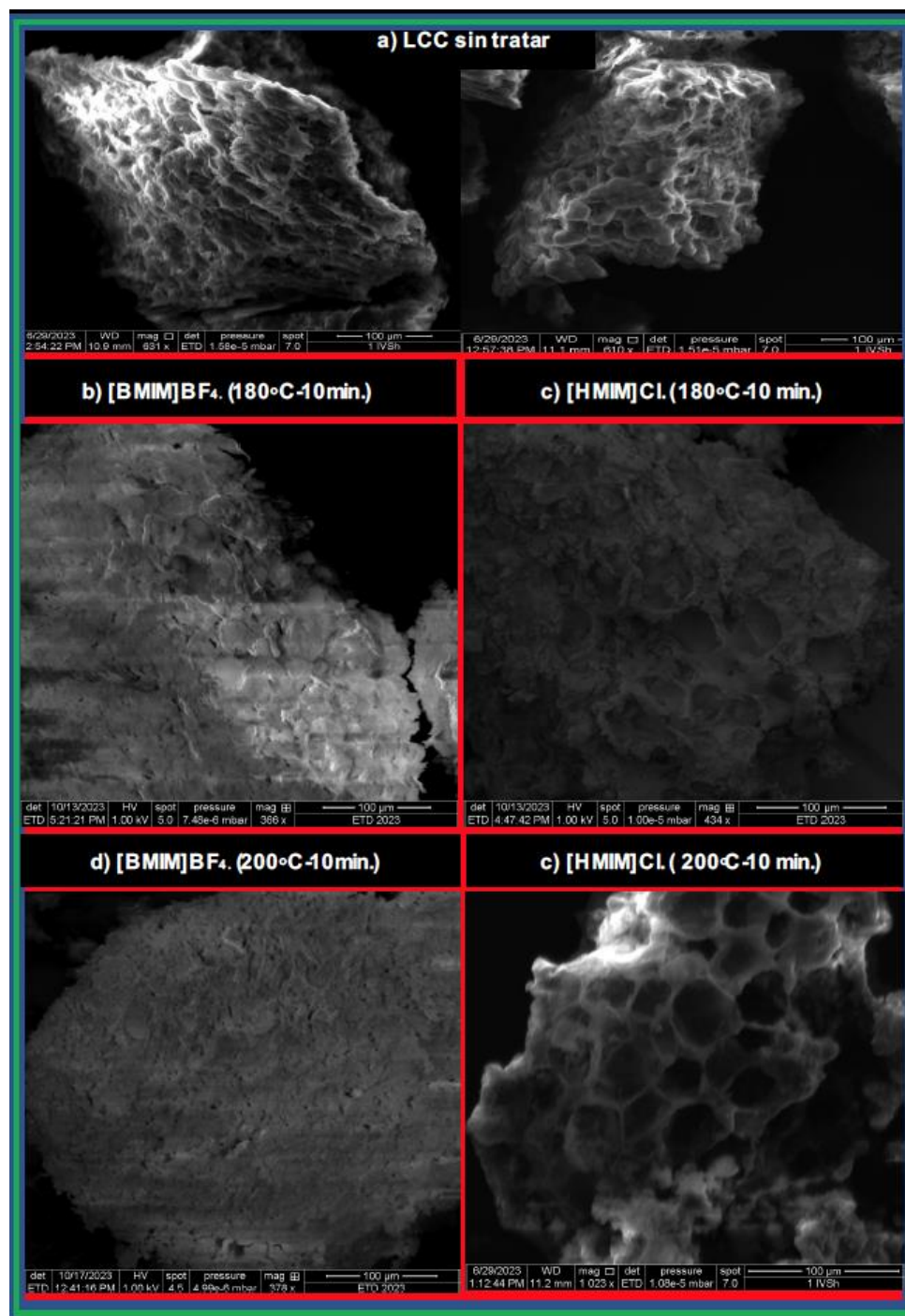


Figura 19. Micrografías SEM de pretratamientos con líquidos iónicos de CMC a 180°C (b y c) y a 200°C (d y e).

Cuando se aumentó más la temperatura (150°C), la superficie vuelve a mostrarse muy heterogénea y desordenada (figuras 18-d y 18-e), es posible que se están

liberando extraíbles remanentes volátiles, o se establezca un efecto por la viscosidad distinta de los LI, que permiten un nivel de penetración, lo que cambia la morfología en ambos líquidos iónicos. Finalmente, al elevar la temperatura a 180 °C (figuras 19-a y 19-b), se observan principalmente, clústeres cristalinos en el tratamiento con [BMIM]BF₄ que podría estar asociados a la liberación de celulosa cristalina. En el caso de [HMIM]Cl a 180 y 200 °C (figuras 19-c y 19-e) el cambio en la morfología más notable es el incremento de porosidad, lo que contrasta con el tratamiento con [BMIM]BF₄ a 200 °C (figuras 19-d), donde al parecer hay un empaquetamiento amorfo del material. En resumen, se puede observar una tendencia de interacción a temperaturas de 100 °C y 150 °C, del líquido iónico [BMIM]BF₄ con el material lignocelulósico de la cáscara de cacao, lo que confirma los cambios estructurales observados por IR. Este análisis fue preliminar, y requiere de otros experimentos para determinar con certeza, cambios en despolimerización y afectación más contundente de la red lignocelulósica.

3.4 Conclusiones

- La cascara de cacao, presenta una composición importante de material lignocelulósico, de más del 50%, por lo que puede ser materia prima alternativa en generación de energía y subproductos de gran interés
- El tamaño de partícula, los líquidos iónicos empleados, así como los tiempos y temperaturas de reacción son parámetros estadísticamente significativos y cruciales en la recuperación de sólidos.
- Con [BMIM]BF₄ los mayores porcentajes de recuperación de sólidos (98-99%) se presentaron para los tamaños de partícula 355 y 250µm (mallas 45 y 60 respectivamente) a temperaturas de 100°C y tiempos de reacción de hasta 15 minutos.
- Con [HMIM]Cl los mayores porcentajes de recuperación de sólidos (98-

80%) se presentaron para los tamaños de partícula 355 y 250 μ m (mallas 45 y 60 respectivamente) a temperaturas de hasta 180°C y tiempos de reacción de hasta 10 minutos.

- Los LI's iónicos empleados se lograron recuperar hasta en un 100% con una alta pureza de acuerdo con los espectros de ^1H -RMN tomados después de los pretratamientos, lo que confirma que es posible su reutilización, por lo que tomando en cuenta las demás ventajas y propiedades que poseen los LI's es posible emplearlos como metodologías verdes.
- Los análisis de IR y SEM, permitieron establecer que el $[\text{BMIM}]\text{BF}_4$ interacciona de manera más eficiente con el material lignocelulósico, lo que puede explotarse para posteriores procesos de obtención de compuestos de valor agregado

3.5 Literatura citada

- Adi-Dako, O., Ofori-Kwakye, K., Frimpong Manso, S., Boakye-Gyasi, M. E., Sasu, C., & Pobee, M. (2016). Physicochemical and antimicrobial properties of cocoa pod husk pectin intended as a versatile pharmaceutical excipient and nutraceutical. *Journal of Pharmaceutics*, 2016, 7608693. <https://doi.org/10.1155/2016/7608693>
- Amini, E., Valls, C., & Roncero, M. B. (2021). Ionic liquid-assisted bioconversion of lignocellulosic biomass for the development of value-added products. *Journal of Cleaner Production*, 326(129275), 129275. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.129275>
- Asim, A. M., Uroos, M., Naz, S., Sultan, M., Griffin, G., Muhammad, N., & Khan, A. S. (2019). Acidic ionic liquids: Promising and cost-effective solvents for processing of lignocellulosic biomass. *Journal of Molecular Liquids*, 287(110943), 110943. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.110943>
- A.M. Asim, M. Uroos, S. Naz, M. Sultan, A.S. Khan, Acidic ionic liquids: promising and cost-effective solvents for processing of lignocellulosic biomass, J. Mol. Liq. 287 (2019) 110943.
- A.V.S.L Sai Bharadwaj, Subhabrata Dev, Jingshun Zhuang, Yunxuan Wang, Chang Geun Yoo, Byong-Hun Jeon, Srijan Aggarwal, Seung Hyun Park, Tae Hyun Kim. (2023). Review of chemical pretreatment of lignocellulosic biomass using low-liquid and low-chemical catalysts for effective bioconversion. *Bioresource Technology*, 368, 128339. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128339>
- Campos-Vega, R., Nieto-Figueroa, K. H., & Oomah, B. D. (2018). Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 172–184
- Guolin H., Jeffrey S., Kai Z. y Xiaolan H. (2011). Application of Ionic Liquids in the Microwave-Assisted Extraction of Pectin from Lemon Peels. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2012: 1-8.
- Hernández-Mendoza, A. G., Saldaña-Trinidad, S., Martínez-Hernández, S., Pérez-Sariñana, B. Y., & Láinez, M. (2021). Optimization of alkaline

pretreatment and enzymatic hydrolysis of cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.) for ethanol production. *Biomass & Bioenergy*, 154(106268), 106268. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106268>

Jing, Y., Mu, X., Han, Z., Liu, C., & Zhang, D. (2019). Mechanistic insight into β -O-4 linkage cleavage of lignin model compound catalyzed by a SO₃H-functionalized imidazolium ionic liquid: An unconventional E1 elimination. *Molecular Catalysis*, 463, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2018.12.002>

Karbuz P. y Tugrul N. (2021). Microwave and ultrasound assisted extraction of pectin from various fruits peel. *J Food Sci Technol*, 58(2), 641–650.

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>

Matsagar, B. M., & Dhepe, P. L. (2015). Brönsted acidic ionic liquid-catalyzed conversion of hemicellulose into sugars. *Catalysis science & technology*, 5(1), 531–539. <https://doi.org/10.1039/c4cy01047g>

Nis, B., & Kaya Ozel, B. (2021). Efficient direct conversion of lignocellulosic biomass into biobased platform chemicals in ionic liquid-water medium. *Renewable Energy*, 169, 1051–1057. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.01.083>

Ofosua Adi-Dako, K. Ofori-Kwakye, S. F. Manso, M. E. Boakye-Gyasi, C. Sasu y M. Pobee. (2016). Physicochemical and antimicrobial properties of cocoa pod husk pectin intended as a versatile pharmaceutical excipient and nutraceutical. *Journal of pharmaceuticals*, 2016.

Okolie, J. A., Nanda, S., Dalai, A. K., & Kozinski, J. A. (2021). Chemistry and specialty industrial applications of lignocellulosic biomass. *Waste and Biomass Valorization*, 12(5), 2145–2169. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01123-0>

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.

- 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
- Reddy, A. V. B., Shah, M. U. H., Ahmad, A., & Moniruzzaman, M. (2022). Introduction to ionic liquids and their environment-friendly applications. En *Ionic Liquid-Based Technologies for Environmental Sustainability* (pp. 1–15). Elsevier.
- Sai Bharadwaj, A. V. S. L., Dev, S., Zhuang, J., Wang, Y., Yoo, C. G., Jeon, B.-H., Aggarwal, S., Park, S. H., & Kim, T. H. (2023). Review of chemical pretreatment of lignocellulosic biomass using low-liquid and low-chemical catalysts for effective bioconversion. *Bioresource Technology*, 368(128339), 128339. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128339>
- Savitskaya, T., Kimlenka, I., Lu, Y., Hrynshpan, D., Sarkisov, V., Yu, J., Sun, N., Wang, S., Ke, W., & Wang, L. (2022). *Green chemistry: Process technology and sustainable development* (1a ed.). Springer.
- Shi, M., Zheng, X., Zhang, N., Guo, Y., Liu, M., & Yin, L. (2023). Overview of sixteen green analytical chemistry metrics for evaluation of the greenness of analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry: TRAC*, 166(117211), 117211. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117211>
- Šibalić, D., Šalić, A., Zelić, B., Tran, N. N., Hessel, V., Nigam, K. D. P., & Tišma, M. (2023). Synergism of ionic liquids and lipases for lignocellulosic biomass valorization. *Chemical Engineering Journal (Lausanne, Switzerland: 1996)*, 461(142011), 142011. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.142011>
- Tanpichai, S., Witayakran, S., & Boonmahitthisud, A. (2019). Study on structural and thermal properties of cellulose microfibrils isolated from pineapple leaves using steam explosion. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(1), 102836. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.102836>

- Tomar, P., & Jain, D. (2022). A review of green solvent ionic liquids: As a future solvent. *Journal of advanced scientific research*, 13(06), 1–16. <https://doi.org/10.55218/jasr.202213601>
- Valladares-Diestra, K.K., de Souza, Porto, Vandenberghe, L., Zevallos Torres, L.A., Zandona 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.
- Vriesmann, L. C., Teófilo, R. F., & Petkowicz, C. L. O. (2011). Optimization of nitric mediated extraction of pectin from cocoa pod husks (*Theobroma cacao* L.) using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 84(4), 1230–1236.
- Villamizar Jaimes, Y., Rodríguez Guerrero, J., León Castrillo, L, (2017). Caracterización fisicoquímica, microbiológica y funcional de harina de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad CCN-51, *Cuaderno Activa*, 9: 65-75.
- Xiaoqi Lin, Kaisen Jiang, Xuebin Liu, Dezhi Han, Qinqin Zhang. (2022). Review on development of ionic liquids in lignocellulosic biomass refining. *Journal of Molecular Liquids*, 359:119326.
- Xu, F., & Wang, D. (2015). Analysis of lignocellulosic biomass using infrared methodology. *Pretreatment of Biomass*, 7–25. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800080-9.00002-5>
- Zhang, Y., Ding, Z., Shahadat Hossain, M., Maurya, R., Yang, Y., Singh, V., Kumar, D., Salama, E.-S., Sun, X., Sindhu, R., Binod, P., Zhang, Z., & Kumar Awasthi, M. (2023). Recent advances in lignocellulosic and algal biomass pretreatment and its biorefinery approaches for biochemicals and bioenergy conversion. *Bioresource Technology*, 367(128281), 128281. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128281>
- Zhu, S. (2008). Use of ionic liquids for the efficient utilization of lignocellulosic materials. *J. Chem. Technol. Biotechnology*. 83(6):777-779.

ANEXO 1. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Resultados obtenidos en el programa SAS., de las ANOVAS y prueba de medias realizadas para el porcentaje de recuperación de solidos totales, mediante un diseño factorial 3^K.

```

Sistema SAS
14:48 Wednesday, May 5, 2023    1

Procedimiento ANOVA

Información del nivel de clase

Clase          Niveles  Valores
TRATAMIENTOS      3    1  2  3
REPETICION        3    1  2  3
TEMPERATURA       4   100 150 180 200
TIEMPO            3    5 10 15

RECUPERACION      102   38.4 38.48 38.6 38.72 39.4 39.96 40.08 41.6
41.72 42.48 42.52 42.92 43.2
43.6 44.55 44.8 44.84 44.92 44.96 45 47.6
49.88 50.36 50.4 50.68 51.88
51.92 52.08 52.36 52.96 53.16 53.76 53.88
53.92 53.96 54.68 55.04 55.32
55.8 56.64 56.84 56.92 57.04 57.8 57.84
58.4 58.44 58.79 58.88 59.12 60.48
61.28 61.48 61.6 62.36 62.8 63 63.2 63.48
63.6 63.88 64 64.64 64.72 64.76
64.84 64.96 65.8 67.04 67.3 67.36 67.4
69.05 70.72 70.96 71.44 72.68 73.44
73.52 73.6 74.88 76.08 77.88 79.36 81.8
94.32 94.56 95.05 95.16 95.96 96.65
96.96 97 97.84 98.3 98.55 98.6 99.12 99.15
99.24 99.25 99.35

```

Número de observaciones 108
Sistema SAS

14:48 Wednesday, May 5, 2023 2

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: RECUPERACION

de				Suma de	Cuadrado
media	Fuente		DF	cuadrados	la
	F-Valor	Pr > F			
	Modelo		17	34888.86303	
2052.28606	151.03	<.0001			
	Error		90	1222.97927	
13.58866					
	Total correcto		107	36111.84230	

	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE
RECUPERACION Media			
	0.966134	5.805013	3.686280
63.50167			

de					Cuadrado
media	Fuente		DF	Anova SS	la
	F-Valor	Pr > F			
	TRATAMIENTOS		2	4902.31744	
2451.15872	180.38	<.0001			
	TEMPERATURA		3	26760.32671	
8920.10890	656.44	<.0001			
	TIEMPO		2	412.03931	
206.01965	15.16	<.0001			
	TRATAMIEN*TEMPERATUR		6	2342.44644	
390.40774	28.73	<.0001			
	TRATAMIENTOS*TIEMPO		4	471.73314	
117.93328	8.68	<.0001			

Sistema SAS

14:48 Wednesday, May 5, 2023 3

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD)
para RECUPERACION

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa

0.05

90	Error de grados de libertad
13.58866	Error de cuadrado medio
3.37024	Valor crítico del rango estudentizado
2.0706	Diferencia significativa mínima

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

TRATAMIENTOS	Tukey Agrupamiento	Media	N
	A	71.9453	36 1
	B	63.1031	36 2
	C	55.4567	36 3
		Sistema SAS	
14:48 Wednesday, May 5, 2023	4		

Procedimiento ANOVA

Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
TRATAMIENTOS	3	1 2 3
REPETICION	3	1 2 3
TEMPERATURA	4	100 150 180 200
TIEMPO	3	5 10 15
RECUPERACION	102	38.4 38.48 38.6 38.72 39.4 39.96 40.08 41.6 41.72 42.48 42.52 42.92 43.2 43.6 44.55 44.8 44.84 44.92 44.96 45 47.6 49.88 50.36 50.4 50.68 51.88 51.92 52.08 52.36 52.96 53.16 53.76 53.88 53.92 53.96 54.68 55.04 55.32 55.8 56.64 56.84 56.92 57.04 57.8 57.84 58.4 58.44 58.79 58.88 59.12 60.48 61.28 61.48 61.6 62.36 62.8 63 63.2 63.48 63.6 63.88 64 64.64 64.72 64.76 64.84 64.96 65.8 67.04 67.3 67.36 67.4 69.05 70.72 70.96 71.44 72.68 73.44 73.52 73.6 74.88 76.08 77.88 79.36 81.8 94.32 94.56 95.05 95.16 95.96 96.65

96.96 97 97.84 98.3 98.55 98.6 99.12 99.15
 99.24 99.25 99.35

Número de observaciones 108
 Sistema SAS

14:48 Wednesday, May 5, 2023 5

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: RECUPERACION

de	Fuente	DF	Suma de	Cuadrado
media	F-Valor	Pr > F	cuadrados	la
	Modelo	35	35649.15503	
1018.54729	158.50	<.0001		
	Error	72	462.68727	
6.42621				
	Total correcto	107	36111.84230	

RECUPERACION Media	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE
63.50167	0.987187	3.992017	2.534997

de	Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado
media	F-Valor	Pr > F		la
	TRATAMIENTOS	2	4902.31744	
2451.15872	381.43	<.0001		
	TEMPERATURA	3	26760.32671	
8920.10890	1388.08	<.0001		
	TIEMPO	2	412.03931	
206.01965	32.06	<.0001		
	TRATAMIEN*TEMPERATUR	6	2342.44644	
390.40774	60.75	<.0001		
	TRATAMIENTOS*TIEMPO	4	471.73314	
117.93328	18.35	<.0001		
	TRATAM*TEMPER*TIEMPO	18	760.29200	
42.23844	6.57	<.0001		

Sistema SAS

14:48 Wednesday, May 5, 2023 6

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD)
para RECUPERACION

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

	Alfa
0.05	
	Error de grados de libertad
72	
	Error de cuadrado medio
6.426212	
	Valor crítico del rango estudentizado
3.38440	
	Diferencia significativa mínima
1.4299	

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

TRATAMIENTOS	Tukey Agrupamiento	Media	N
	A	71.9453	36 1
	B	63.1031	36 2
	C	55.4567	36 3