



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
COLEGIO DE INGENIERÍA QUÍMICA

Tesis:

**“Diseño de experimentos basado en el pretratamiento
alcalino para la extracción de lignina en cáscara de sábila”**

Para obtener el título de
Licenciatura en Ingeniería Química

Presenta:

Mayte Pineda Sarabia

Director de Tesis:

Dra. Juana Deisy Santamaría Juárez

Co-Asesor de Tesis:

Dra. Celeste Santamaría Juárez

Fecha:

Febrero 2024



BUAP

Oficio No. FIQ/AC/054/2024
Asunto: Registro de Tema de Tesis.

C. MAYTE PINEDA SARABIA
PASANTE DE LA LICENCIATURA EN
INGENIERÍA QUÍMICA
P R E S E N T E:

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la Licenciatura en Ingeniería Química cuyo título es el siguiente:

“DISEÑO DE EXPERIMENTOS BASADO EN EL PRETRATAMIENTO ALCALINO PARA LA EXTRACCIÓN DE LIGNINA EN CÁSCARA DE SÁBILA”

Con el siguiente contenido:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1	ANTECEDENTES
CAPÍTULO 2	METODOLOGÍA
CAPÍTULO 3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA

Directora de Tesis: Dra. Juana Deisy Santamaría Juárez.

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **ÚNICAMENTE POR UN AÑO**.

Atentamente,
"Pensar Bien, Para Vivir Mejor."
H. Puebla de Z., a 28 de febrero de 2024

Dra. Valeria Jordana González Coronel
Secretaria Académica

C.c.p. Directora de Tesis: Dra. Juana Deisy Santamaría Juárez.
C.c.p. Archivo.

Facultad
de Ingeniería
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San
Manuel, Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C.P. 72590
01 (222) 229 55 00
Exts. 7250 y 7251

Planteamiento Del Problema

Desarrollar materiales que reemplacen a los materiales poliméricos derivados del petróleo, es un reto. Además de procurar y garantizar que sean respetuosos con el medio ambiente y con buenas propiedades mecánicas, térmicas y químicas. Los plásticos son ampliamente utilizados en diversas áreas: salud, envasado de medicamentos, alimentos, entre otros. Todos los días se generan grandes cantidades de residuos plásticos y a pesar de que desarrollan nuevos materiales poliméricos biodegradables, estos no son suficientes para la alta demanda.

Existen compuestos de denominación biobasados como los biopolímeros, los cuales son una alternativa para sustituir a los plásticos sintéticos. Una de las principales desventajas, es que existe un déficit en su producción y no abastecen las altas cantidades de materia prima que se necesita en la industria, además de que son de mayor costo que los materiales sintéticos. Por lo descrito, la extracción de biopolímeros como la celulosa a partir de la cáscara de sábila es de interés en el presente proyecto de tesis.

Dentro de los residuos generados en México se encuentra la cáscara de la planta de sábila, la cual se cultivan alrededor de 360 especies diferentes [1]. La acumulación de los desechos de esta planta causa contaminación ambiental por la generación de gases tóxicos como metano (CH_4) y ácido sulfúrico (H_2SO_4), pH ácido (4), olores desagradables y generación de fauna nociva.

Esta cáscara se genera en el proceso de despulpamiento y comercialización de productos que son derivados de la planta de aloe vera. Aproximadamente el 50% del residuo generado corresponde a la cáscara, la cual es desechada sin control alguno.

Justificación

La cáscara de la planta de sábila después de ser cortada y sometida al proceso de despulpamiento para la obtención del gel de aloe vera, contiene una serie de compuestos de bajo peso molecular (compuestos fenólicos, ceras, etc.) así como estructurales como lignina (9.68%), celulosa (19.76%), hemicelulosa (12.45%) [2].

Los residuos lignocelulósicos de la planta de sábila se pueden utilizar como un recurso biológico potencial para la producción de materiales de valor agregado debido a su relativa disponibilidad, viabilidad económica a largo plazo, naturaleza renovable y biodegradabilidad. Además, la biomasa lignocelulósica tiene potencial para sustituir total o parcialmente los plásticos derivados del petróleo y otros materiales petroquímicos, ya que pueden ser transformados en acetato de celulosa (CA), lo que abre un abanico de aplicaciones en la industria del plástico.

Se propone entonces utilizar y aprovechar estos residuos en la fabricación de un biopolímero de interés comercial, el cual se emplearía como materia prima en la elaboración de un bioplástico para la producción de artículos biodegradables

4

El residuo agrícola en la industria tiene impactos ambientales, sociales y económicos. Lo que se podría convertir en una de las soluciones para la sostenibilidad y reducir los residuos agrícolas en vertederos para aliviar la contaminación existente, sino que también reduciría la dependencia del petróleo, posiblemente con el consiguiente ahorro económico.

De acuerdo a la revisión bibliográfica nos hay artículos e investigaciones centrada en la valorización y en el tratamiento para la deslignificación de la cáscara de sábila. Por lo anterior el objetivo del presente trabajo es establecer una metodología para la cuantificación de la lignina en medio alcalino de la cáscara sábila a través de un diseño de experimentos factorial 2^k .

Objetivos

General

Establecer un diseño de experimentos basado en el pretratamiento alcalino para la extracción de lignina en cáscara de sábila.

Específicos

1. Realizar una revisión bibliográfica en revistas especializadas referentes a tema de tesis.
2. Realizar la propuesta del diseño de experimentos 2^k con las variables: tiempo (X_1), relación líquida (sol. NaOH 4%) (X_2) y relación sólida (cáscara) (X_3), siendo la variable de respuesta la concentración de lignina removida.
3. Determinar la concentración de lignina utilizando la técnica de espectrofotometría UV/VIS.
4. Evaluar el efecto de deslignificación de cáscara de sábila pretratadas con NaOH al 4% a fin de maximizar la remoción de lignina.

Hipótesis

La deslignificación alcalina es un proceso de pretratamiento muy popular y rentable que implica el uso de un reactivo alcalino. El hidróxido de sodio permite obtener altos porcentajes de extracción de lignina presente en las fibras de sábila, y se considera el álcali más eficiente para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica. Esto incrementará la disponibilidad de celulosa y el rendimiento para su determinación.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Desechos lignocelulósicos

Debido al constante aumento de la población, el mundo está experimentando un aumento de las actividades forestales y agrícolas, así, los desechos lignocelulósicos se producen masivamente cada año, provienen principalmente a través de la silvicultura, la agricultura, industria forestal, industria de procesamiento de alimentos, desecho doméstico y la industria papelera.

Los desechos lignocelulósicos abarcan todo tipo de materia orgánica derivada de los árboles, plantas y desechos de animales. En la industria forestal, se generan residuos como corteza, ramas, hojas y aserrín. En la agricultura, los residuos pueden incluir tallos, hojas, cáscaras y ramas de diferentes cultivos. En la industria alimentaria, se generan residuos como cáscaras de frutas y verduras, pulpas, residuos de café y bagazo de la caña de azúcar. Así como también desechos forestales, incluidos astillas de madera, aserrín, cedro, etc. [3].

México cuenta con una industria forestal significativa, así como una gran actividad agrícola, lo que contribuye a la generación de estos desechos en gran cantidad. El aprovechamiento de residuos orgánicos se centra principalmente en su uso como alimento para el ganado, sin priorizar otros beneficios.

Debido a la falta de enfoques industriales rentables y respetuosos con el medio ambiente, la mayoría de los abundantes residuos agrícolas y forestales siempre se eliminan en vertederos o incineración, lo que genera contaminación y desperdicio de recursos de la biomasa lignocelulosa [4, 5]. Esta actividad conlleva a generar la emisión de gases de efecto invernadero, como amoníaco y metano, contribuyendo al calentamiento global.

En la actualidad, las biomásas lignocelulósicas han sido objeto de interés especial en la investigación debido a su amplia disponibilidad, rentabilidad y carácter renovable [6, 7].

La abundante disponibilidad de materiales lignocelulósicos hace que sea más adecuado apostar por la energización de este material de desecho. Los residuos agrícolas son esencialmente una fuente de energía renovable y neutra en carbono. Tiene el potencial de promover la sostenibilidad y aliviar la contaminación existente al reducir la tasa de eliminación de residuos mediante la adopción de rutas adecuadas de conversión de biomasa para minimizar su impacto negativo y aprovechar su potencial de manera sostenible [8].

1.2 Composición química de los materiales lignocelulósicos

La biomasa lignocelulósica, también conocida como fibras naturales o celulósicas, es la pared celular vegetal de un conjunto de tejidos celulósicos, principalmente compuesta por polisacáridos: celulosa (30%-50%) y hemicelulosa (15%-35%) y polímeros aromáticos lignina (10%-30%), así como otros componentes menores como pectina, proteína, grasas, sales, minerales, etc. cuya composición depende de la materia prima de que se trate, edad y su entorno ambiental para el desarrollo y crecimiento [9].

Estas biomásas o sus residuos a menudo tienen grupos funcionales hidroxilo (-OH) y carboxílicos (-COOH) en su superficie y son livianos y porosos. El componente fundamental del complejo lignocelulósico es la celulosa, que forma una estructura esquelética a lo largo de la pared celular. Los huecos internos también están llenos de compuestos aglutinantes, como la lignina y la hemicelulosa, un polisacárido complejo que sirve como puente entre la celulosa y la lignina, esto puede observarse en la figura 1. Estos componentes están unidos entre sí a través de enlaces de hidrógeno y covalentes, formando una estructura altamente recalcitrante [10].

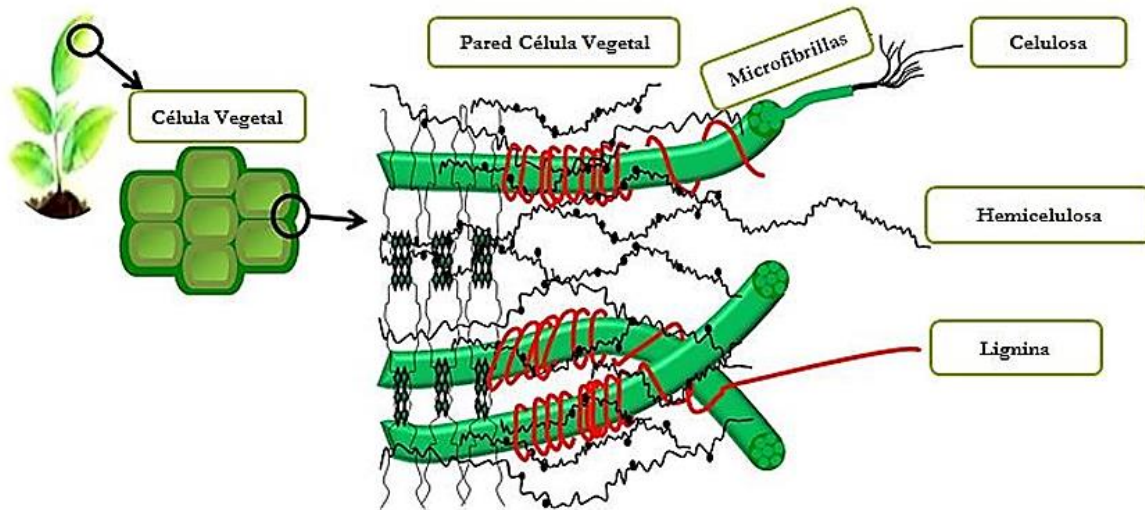


Figura 1. Estructura de la biomasa lignocelulósica [11].

1.2.1 Celulosa

La celulosa es un polisacárido formado por la unión lineal de unidades de glucosa mediante enlaces glucosídicos beta (β -1,4). Su fórmula química general es $(C_6H_{10}O_5)_n$, donde "n" representa el número de unidades de glucosa en la cadena polimérica. Puede formar microfibrillas con estructuras altamente cristalinas gracias a los enlaces de hidrógeno entrecruzados. Las microfibrillas también se asocian para formar macrofibrillas o fibras celulósicas [12]. La figura 2 muestra la estructura química de la celulosa.

Su composición química y estructural la convierten en el componente principal de las paredes celulares de las plantas y en uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza [13].

La celulosa desempeña una función crucial en la estructura de las plantas, proporcionando rigidez y resistencia mecánica a los tejidos vegetales, lo que les permite mantener su forma y soportar la fuerza de gravedad y las tensiones mecánicas [14].

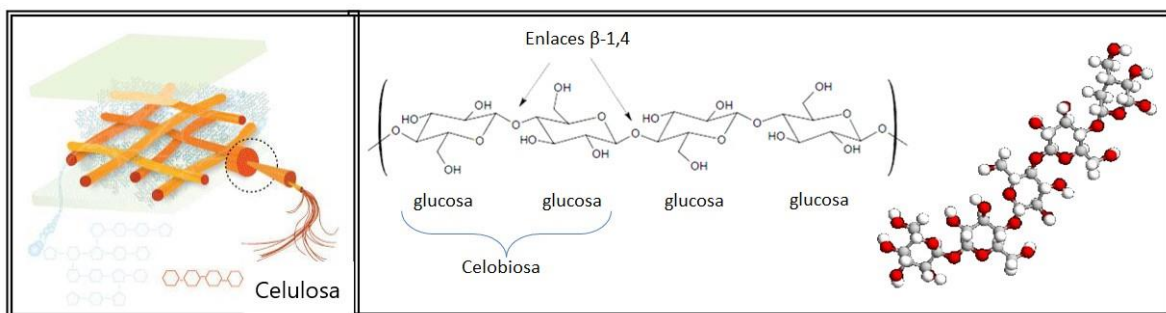


Figura 2. Molécula de celulosa y su estructura química [15].

1.2.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante en las plantas [16]. Las moléculas de hemicelulosa están presentes en varios polímeros que consisten en pentosas (D-xilosa y D-arabinosa) y hexosas (D-manosa, D-glucosa y D-galactosa) con la xilosa como el azúcar más abundante [17]. Además, los ácidos urónicos (ácidos D-glucurónico, D-galacturónico y metilgalacturónico) también pueden estar presentes en cadenas ramificadas [18]. Los polímeros de hemicelulosa suelen estar interconectados por enlaces covalentes y de hidrógeno. La figura 3 muestra una imagen representativa de la hemicelulosa y su estructura.

9

Las hemicelulosas comprenden una familia de polisacáridos complejos que comparten con la celulosa una columna vertebral de enlaces glicosídicos (β -1-4), pero están sustituidas y construidas por una amplia variedad de monosacáridos (glucosa, xilosa, galactosa, fucosa, manosa, etc.) [19]. De hecho, a diferencia de la celulosa, no forma microfibrillas [20].

En cuanto a su función, la hemicelulosa cumple varias funciones importantes en las plantas. Ayuda a mantener la integridad estructural de las paredes celulares, proporciona flexibilidad a los tejidos vegetales y contribuye a la absorción de agua y nutrientes. Además, la hemicelulosa participa en la interacción entre la celulosa y otros componentes de la pared celular, como la lignina, para conferir resistencia y rigidez a la planta [21].

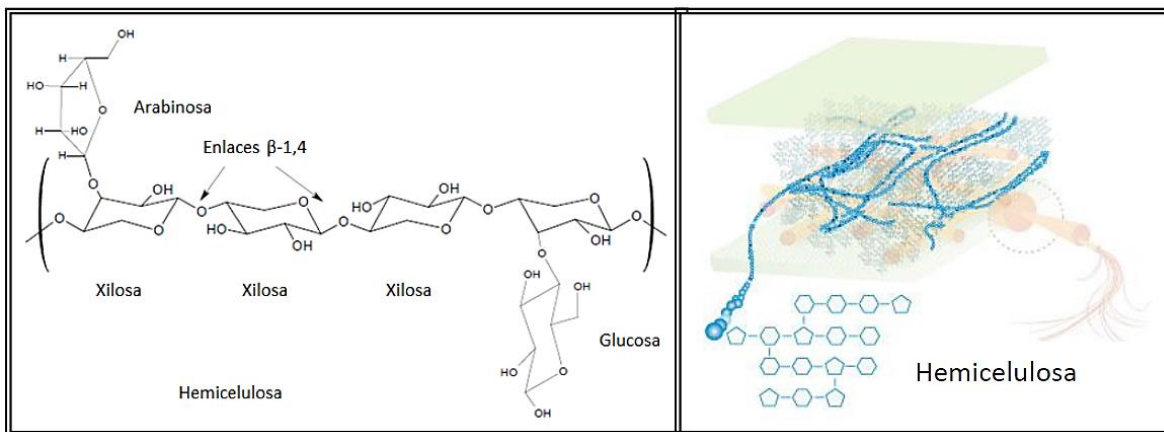


Figura 3. Estructura química de la hemicelulosa y su representación en la pared celular [22].

1.2.3 Lignina

La lignina es el tercer componente de la biomasa lignocelulósica y es el polímero aromático más abundante en el mundo [23]. Está compuesta estructuralmente por tres monómeros fenilpropanoides, también llamados monolignoles, incluidos el alcohol coniferílico, p-cumarílico y sinapílico unidas en una red tridimensional. El acoplamiento de radicales entre los tres principales monómeros de lignina conduce a la formación de una amplia gama de enlaces entre unidades, que involucran principalmente enlaces carbono-oxígeno (C-O) (éter) y enlaces carbono-carbono (C-C) [24]. La abundancia de enlaces éter en la lignina es relativamente alta (45–48%) y la repartición entre diferentes enlaces es función del tipo de biomasa [25]. Una vez incorporados en el polímero de lignina, estos sustituyentes se distinguen por estructuras de anillos aromáticos y se denominan sustituyentes guaiacilo, p-hidroxifenilo y siringilo, elementos principales de la estructura de la lignina [26], como se muestra en la figura 4. Las proporciones siringilo/guaiacilo se utilizan comúnmente para clasificar las ligninas [27]

La presencia y proporción de grupos funcionales (grupos alifáticos, hidroxilofenólicos, carboxílicos, carbonilo y metoxi) en la lignina, un polímero amorfo y complejo, dependen de la fuente agrícola y los métodos de extracción empleados [28].

La función principal de la lignina es proporcionar rigidez y resistencia a las estructuras vegetales, contribuyendo a la impermeabilización de las paredes celulares y a la protección contra la degradación por agentes externos, como patógenos y herbívoros. Además, la lignina juega un papel crucial en el transporte de agua y nutrientes a través del xilema, al mismo tiempo que brinda soporte estructural a las plantas [29].

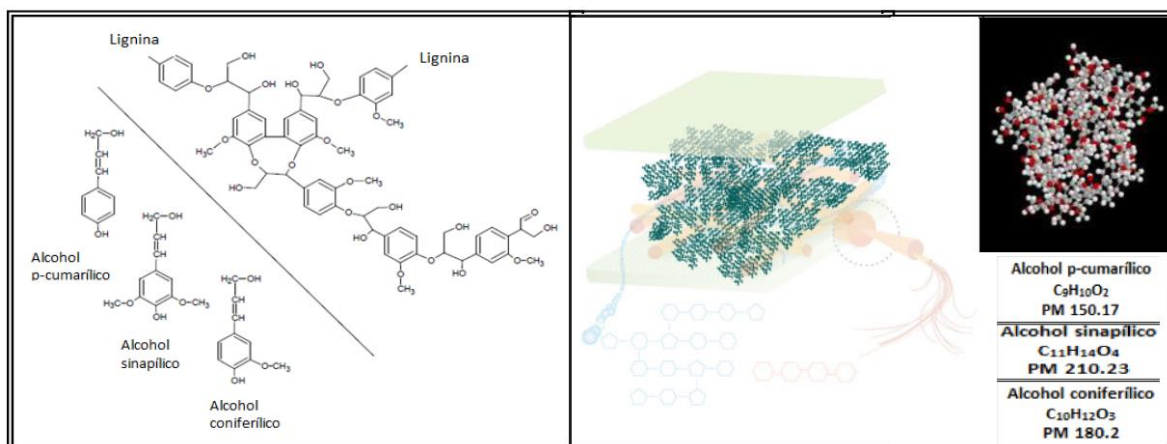


Figura 4. Estructura química de la lignina y su representación en la pared celular [22].

1.3 Aplicaciones de los materiales lignocelulósicos

La celulosa, la hemicelulosa y la lignina desempeñan funciones significativas en diversas aplicaciones industriales y biotecnológicas.

La celulosa es ampliamente utilizada en la fabricación de papel y cartón, donde actúa como aglutinante y proporciona resistencia al producto final, debido a su estructura fibrosa y resistencia mecánica [30]. Además, se emplea en la producción de fibras textiles sintéticas, como el rayón y la viscosa, debido a sus propiedades de absorción de humedad y resistencia a la tracción [31]. También se utiliza en la fabricación de películas, recubrimientos, adhesivos y materiales compuestos [32].

Por otro lado, la hemicelulosa tiene aplicaciones en la industria alimentaria como espesante, estabilizante y agente gelificante. También se utiliza en la producción de biocombustibles y productos químicos a partir de biomasa lignocelulósica. Además,

la hemicelulosa se emplea en la fabricación de películas biodegradables, materiales compuestos y recubrimientos [33].

Finalmente, la lignina se utiliza como adhesivo en la fabricación de tableros de partículas y fibras, contribuyendo a la industria de la construcción y el mobiliario. Además, se emplea en la producción de biocombustibles y productos químicos mediante su despolimerización y conversión [34]. La lignina también es un componente importante en la fabricación de productos químicos, como aromatizantes, fenoles y resinas [35].

Estos componentes de la biomasa lignocelulósica juegan un papel crucial en una amplia gama de aplicaciones industriales y comerciales, contribuyendo a la sostenibilidad y diversificación de la economía basada en recursos naturales [36].

1.4 Sábila

A medida que el mundo avanza hacia el desarrollo sostenible, se promueve el consumo de productos naturales entre los consumidores y, por lo tanto, la sábila, una especie de planta suculenta, encuentra una posición destacada.

El gel de aloe vera (AV) ha sido ampliamente utilizado en diversas aplicaciones médicas, cosméticas y nutracéuticas, debido a sus beneficios para la salud aportados por una cantidad significativa de elementos nutricionales esenciales [37]. Sin embargo, la cáscara de AV, la capa exterior más resistente de las hojas de aloe vera donde se encuentran los componentes de la pared celular, se ha separado del gel de aloe durante su procesamiento industrial y no tiene ningún uso comercial, se trata actualmente como fertilizante o es vertido como desecho [38].

Sin embargo, la acumulación de una gran cantidad de cáscara de hoja de AV en la industria debe convertirse de manera eficiente en productos de valor agregado para maximizar el rendimiento económico de las industrias de procesamiento de AV y también resolver las preocupaciones asociadas con la eliminación [39].

El análisis composicional de la corteza de aloe vera [37] mostró una alta fracción de constituyentes holocelulósicos [74,11 % \pm 3,68 (p/p)] mientras que la lignina se encontraba dentro de un rango de 11,40 % \pm 0,28 (p/p).

La corteza de aloe vera (AVR), una biomasa sólida descartada después de la extracción del gel que no encuentra importancia comercial, podría servir como una potente materia prima lignocelulósica que requiere un pretratamiento eficiente para eliminar la lignina [38].

1.5 Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica

El pretratamiento de la biomasa lignocelulósica es un paso fundamental en la producción de biocombustibles, productos químicos y otros bioproductos de valor añadido.

Como la biomasa lignocelulósica es compleja y fuertemente resistente a la hidrólisis enzimática debido a su obstinación, se necesita un tratamiento previo para aumentar las tasas de hidrólisis. Por lo tanto, el pretratamiento es esencial para alterar la estructura de la biomasa lignocelulósica como se muestra en la figura 5 e iniciar el proceso de deslignificación [40].

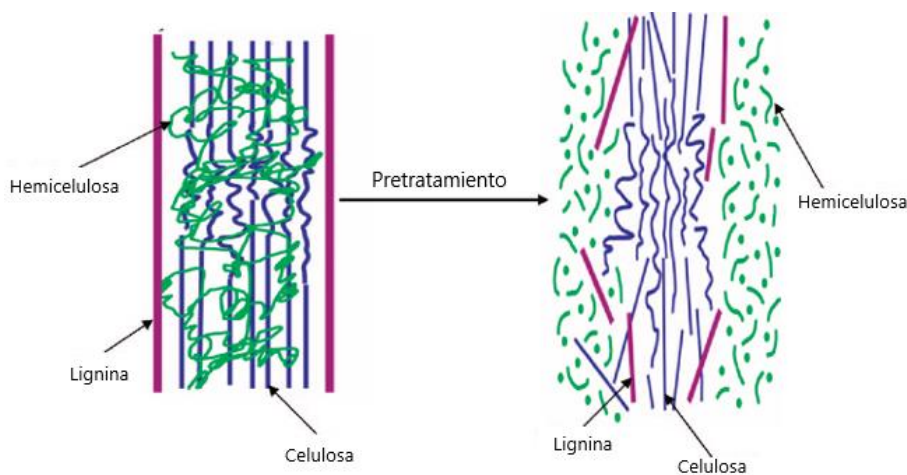


Figura 5. Función del pretratamiento en la biomasa lignocelulósica [41].

Un pretratamiento debe tener las siguientes características deseables [42]:

1. Mejorar la accesibilidad de los componentes de la biomasa
2. Aumentar el rendimiento de azúcares fermentables y otros compuestos de interés
3. Evitar la formación de subproductos indeseables
4. Ser eficiente y rentable

Durante las últimas décadas se han desarrollado varias técnicas de pretratamiento que aumentan la accesibilidad de los materiales lignocelulósicos, modificando las composiciones químicas o las estructuras de la pared celular [43]. Las técnicas de pretratamiento son categorizadas en químicas (que incluyen hidrólisis en medio ácido diluido y básico), físicas (pulverizado), fisicoquímicas (explosión de fibra de amoníaco, oxidación húmeda, explosión de vapor) y pretratamientos biológicos [44].

1.5.1 Pretratamiento alcalino

El pretratamiento alcalino es uno de los procesos más comúnmente aplicados entre los diferentes métodos de pretratamiento propuestos para la deslignificación de la biomasa lignocelulósica.

El pretratamiento alcalino es un proceso de pretratamiento muy popular y rentable que implica el uso de un reactivo alcalino para la disolución de lignina y hemicelulosa en biomasa [45]. Se considera un método eficaz para maximizar la degradación de materiales complejos, rompiendo los enlaces éster entre la lignina y otros compuestos y previniendo la fragmentación de la hemicelulosa [46].

El tipo de alcalino, la concentración, el tiempo de reacción, la temperatura y las características propias de la biomasa utilizada son factores críticos que influyen en la eficiencia del pretratamiento alcalino [45]. Los álcalis comúnmente utilizados para la eliminación de lignina de la biomasa incluyen hidróxido de sodio [47], amoníaco [48], carbonato de sodio [49] e hidróxido de calcio [50].

Sin embargo, el hidróxido de sodio (NaOH) se considera el álcali más eficiente para el pretratamiento de biomasa de lignocelulosa y es el álcali más utilizado para la solubilización de lignina y hemicelulosa. Además, el hidróxido de sodio está fácilmente disponible y es relativamente barato, tiene una alta alcalinidad y un manejo relativamente fácil, lo que lo convierte en una opción atractiva para aplicaciones industriales a gran escala [51]. A menudo se utiliza en combinación con otros productos químicos y procesos para optimizar la eficiencia del pretratamiento.

1.6 Análisis para la determinación de lignina

Las técnicas para la determinación de la lignina son fundamentales para determinar la cantidad de este componente presente en la biomasa lignocelulósica. Estas técnicas permiten determinar la concentración total de lignina, como su composición y estructura química.

Se han realizado varios estudios para desarrollar técnicas cuantitativas y cualitativas de identificación y determinación de lignina. La lignina es cuantificada típicamente mediante métodos gravimétricos, espectroscópicos, cromatográficos y enzimáticos [52].

Los métodos químicos tradicionales, como el método Klason, se basan en la despolimerización de la lignina con ácidos fuertes para determinar su contenido [53]. Por otro lado, los métodos espectroscópicos, como la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia infrarroja cercana (NIR), y la espectroscopía UV/VIS permiten analizar muestras mediante la construcción de curvas de calibración utilizando estándares de lignina purificada, es posible determinar el contenido de lignina en una muestra desconocida a partir de su absorbancia a una longitud de onda específica [54].

Finalmente, las técnicas cromatográficas, como la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se utilizan para separar y

cuantificar los diferentes componentes de la lignina con alta precisión [52].

1.6.1 Espectrofotometría UV/Vis

La espectrofotometría UV-Vis ha demostrado ser una técnica analítica muy poderosa, ampliamente utilizada en diversos campos científicos [55] debido a su versatilidad, precisión, rapidez y rentabilidad en la determinación cuantitativa de diferentes analitos de sustancias en solución acuosa, mediante la absorción de luz ultravioleta (UV) y visible (VIS) [56].

Esta metodología se fundamenta en la capacidad de las moléculas en solución de absorber la radiación electromagnética que incide sobre ellas, ya sea en forma total o parcial. La capacidad de absorción energética de las moléculas en una longitud de onda específica varía según la estructura atómica y de diversas condiciones del entorno, como la temperatura, el pH, la fuerza iónica, entre otros [57].

En la espectroscopia UV-Vis, los electrones de los analitos que absorben la radiación de luz ultravioleta con rango de 200 a 400 nm) y la radiación visible de 400 a 700 nm, como se ilustra en la figura 6, se excitan desde el estado fundamental a estados excitados [58].

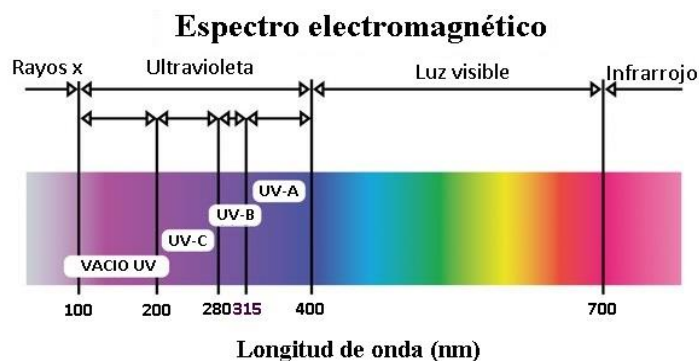


Figura 6. Representación esquemática del espectro electromagnético [59].

Cuando la luz pasa a través de una molécula, la energía de la luz se utiliza para promover un electrón desde un orbital enlazante o no enlazante a uno de los orbitales antienlazantes vacantes, lo que resulta en un salto de electrones. Cada

salto requiere energía de la luz y los saltos grandes requieren más energía que los saltos pequeños. Cada longitud de onda de la luz tiene una energía determinada. Si una cierta cantidad de energía es la adecuada para realizar uno de estos saltos de energía, entonces esa longitud de onda será absorbida y la energía se utilizará para promover el electrón. Cuanto mayor es la energía requerida, menor es la longitud de onda absorbida [60].

Para medir la absorbancia de una muestra, se utiliza un espectrofotómetro. Las partes principales de un espectrofotómetro UV-Vis como se observa en la figura 7, incluyen principalmente una fuente de luz (generalmente una lámpara de deuterio para UV y una lámpara de tungsteno para visible), un monocromador que permite para seleccionar la longitud de onda deseada, una celda destinada a contener la muestra, un detector fotosensible y un sistema de registro de datos y análisis [61].

La muestra se coloca en una celda transparente y se expone a la fuente de luz monocromática, mientras el detector registra la cantidad de luz transmitida a través de la muestra. La absorbancia se calcula mediante la ley de Beer-Lambert, que establece una relación lineal entre la concentración de la muestra y la absorbancia medida a una longitud de onda específica [62].

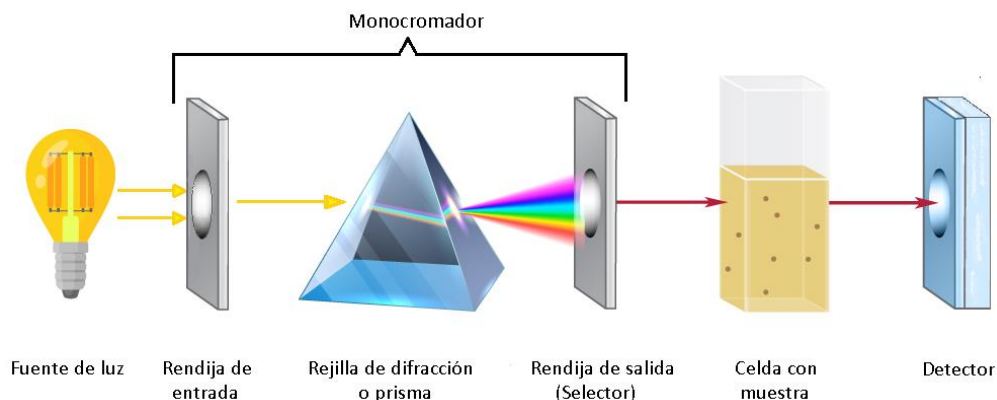


Figura 7. Instrumentación típica de un espectrofotómetro [63].

La espectrofotometría UV-Vis es esencial en la determinación cuantitativa y cualitativa de una amplia gama de compuestos orgánicos e inorgánicos. Esta

técnica proporciona información valiosa sobre la estructura molecular, la concentración de muestras y la cinética de reacciones químicas [52], lo que la convierte en una herramienta indispensable en la investigación científica y el control de calidad industrial.

1.7 Técnicas para la cuantificación de la celulosa.

La cuantificación de la celulosa, como componente clave de la biomasa lignocelulósica, se logra mediante una variedad de técnicas analíticas [64]. Al igual que la lignina, es cuantificada mediante métodos gravimétricos, espectroscópicos y enzimáticos.

Estas técnicas y métodos ofrecen una variedad de enfoques para cuantificar la celulosa y otros componentes de la biomasa, lo que permite una comprensión más completa de su composición y estructura química.

Por otro lado, el análisis de fibra cruda, también conocido como método de Weende, es otra técnica comúnmente utilizada para determinar la cantidad de celulosa junto con otros componentes fibrosos.

1.7.1 Análisis de fibra cruda

El método de Weende, desarrollado en el siglo XIX, se basa en la extracción de los componentes solubles en agua y etanol de la muestra, dejando los componentes insolubles, como la celulosa, la lignina y los hemicelulósicos, que constituyen la fibra cruda [65].

Este método implica la digestión de la muestra con ácidos y álcalis para eliminar las proteínas, azúcares y grasas solubles en agua y alcohol, dejando atrás los componentes fibrosos. Luego, se cuantifica la cantidad de fibra cruda restante, que incluye principalmente celulosa, hemicelulosa y lignina, y se expresa como porcentaje de la muestra [66].

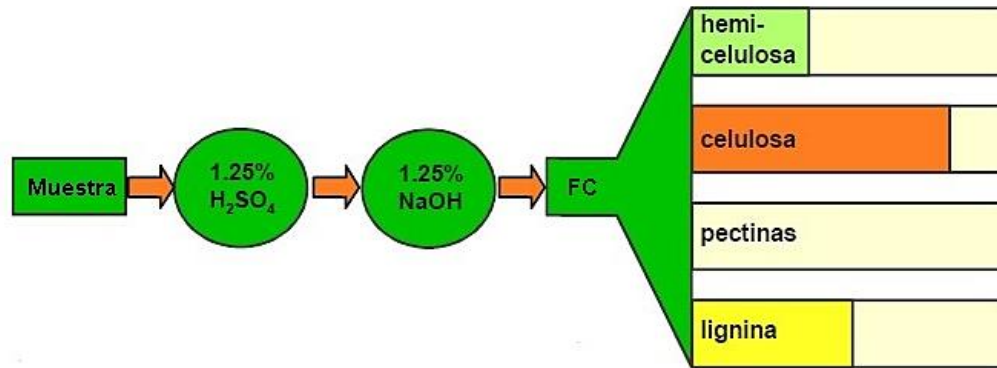


Figura 8. Descripción breve del análisis de fibra cruda (método Weende)

1.8 Diseño de experimentos

El diseño de experimentos es fundamental en la investigación científica porque proporciona un enfoque sistemático para planificar, ejecutar y analizar experimentos con el objetivo de comprender y mejorar los procesos o fenómenos estudiados, además que permite controlar variables, minimizar sesgos y obtener resultados confiables.

19

La selección de un diseño de experimentos adecuado depende de varios factores, incluyendo el objetivo de la investigación, la naturaleza de las variables involucradas y las restricciones del estudio [67].

Algunos criterios a considerar son:

- Tipo de variable: Se debe determinar si las variables son categóricas o continuas, y si son independientes o dependientes.
- Tamaño de la muestra: Es importante calcular el tamaño de la muestra necesario para detectar efectos significativos con suficiente poder estadístico.
- Replicación: Se debe decidir cuántas veces se repetirá cada condición experimental para aumentar la fiabilidad de los resultados.
- Control de variables: Se deben identificar y controlar todas las variables que puedan influir en los resultados para garantizar la validez interna del estudio.

Hoy en día, existen muchos diseños de escaneo en la literatura. Si bien algunos de estos diseños compiten, otros se encuentran en puntos diferentes según el nivel de efecto y las relaciones de los factores de riesgo en los resultados. Para los factores de alto riesgo, se utilizan diseño de experimentos, llamados diseños de detección de primer orden. Las no linealidades y/o interacciones significativas entre atributos analíticos críticos revelan diseño de experimentos llamados diseños de superficie de respuesta. Los diseños de optimización más utilizados pueden enumerarse como diseño factorial completo, diseño compuesto central, diseño de Box Behnken y diseño óptimo [68].

1.7.1 Diseño factorial 2^k

Los diseños factoriales se utilizan ampliamente en experimentos que involucran varios factores, ya que, permiten estudiar simultáneamente los efectos que pueden tener varios factores en la optimización de un proceso concreto. Determina qué factores tienen efectos importantes en la respuesta y cómo varía el efecto de un factor con el nivel de los otros factores. Los efectos son las cantidades diferenciales que expresan cómo cambia una respuesta a medida que cambian los niveles de uno o más factores. Además, los diseños factoriales permiten medir la interacción entre cada grupo diferente de factores. Las interacciones son el motor de muchas optimizaciones de los procesos. Sin el uso de experimentos factoriales, algunas interacciones importantes pueden pasar desapercibidas y es posible que no se logre la optimización general [69].

El diseño factorial tiene varios casos especiales, uno de los tipos más simples utilizados en el trabajo experimental es el que tiene dos niveles (2^k), donde “k” representa el número de factores o variables. Estos niveles pueden ser cuantitativos, como dos valores de concentración, temperatura o tiempo; o pueden ser cualitativos, como los niveles “alto” y “bajo” de un factor, o quizás la presencia y ausencia de este. Un diseño completo requiere 2^k ejecuciones [70] y se denomina diseño factorial 2^k .

La elaboración de la matriz para un diseño de experimentos 2^k sigue un proceso sistemático. En primer lugar, se identifican los factores y se determinan los niveles que cada uno puede tomar. Luego, se asignan códigos a los niveles, a cada factor se le pueden asignar dos niveles: bajo (1) y alto (+1). El siguiente paso implica calcular el número total de experimentos, si se consideran k factores, entonces se requieren 2^k experimentos [69]. Posteriormente, se crea la matriz de diseño, una tabla con una fila para cada experimento y una columna para cada factor. En esta tabla, se representan cada nivel de cada factor con el código asignado anteriormente. Finalmente, se llenan las filas de la matriz asignando las combinaciones de niveles de los factores como se muestra en la Tabla 1. Es fundamental garantizar que todas las combinaciones posibles estén representadas correctamente y que no haya duplicados.

El diseño 2^k es especialmente beneficioso al inicio de una investigación experimental, especialmente cuando se espera investigar múltiples factores. Permite investigar k factores utilizando el menor número posible de ejecuciones en un diseño factorial completo. Por lo tanto, estos diseños son ampliamente empleados en experimentos que involucran la selección de los factores. [70].

	X_1	X_2	X_3
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

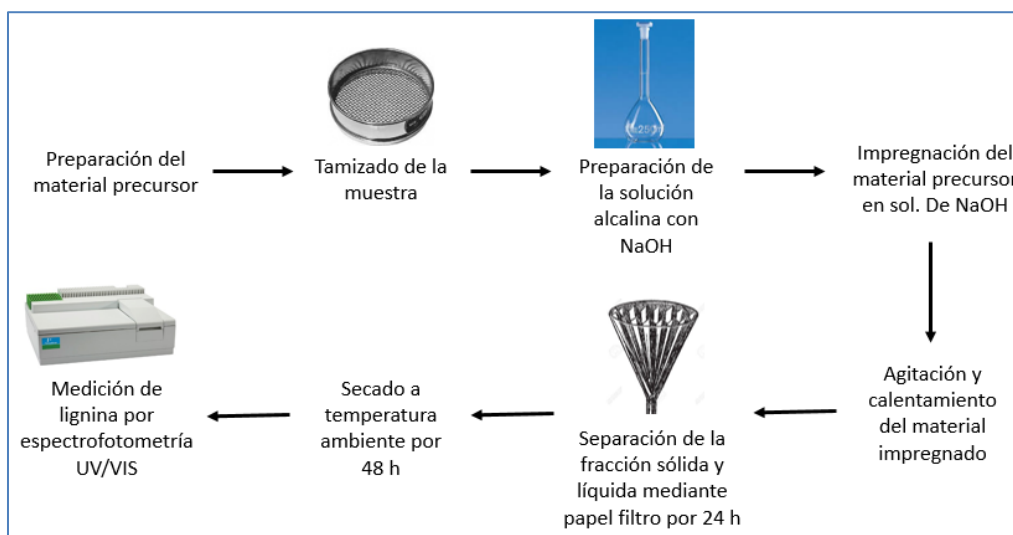
Tabla 1. Matriz de experimentos de un diseño factorial 2^k

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

2.1 Deslignificación alcalina

La metodología para la realización de este trabajo se basó en la recopilación de datos bibliográficos y la propuesta de un diseño de experimentos a fin de conseguir los mejores resultados posibles. La metodología se resume en la figura 9.



22

Figura 9. Metodología para el proceso deslignificación alcalina.

La primera etapa del trabajo consistirá en la preparación del material precursor, en este caso, la fibra de cáscara de sábila obtenida de la planta. Se requerirá que este material se encuentre triturada finamente para posteriormente ser tamizada con un tamaño de partícula número 20 (0.0331 in) - 60 (0.0098 in).



Figura 10. Tamiz granulométrico

Una vez pasada la muestra por el tamiz, se procederá a preparar una solución de NaOH al 4% m/v, este con el fin de realizar el pretratamiento alcalino y facilitar la remoción de lignina en las fibras de sábila.



Figura 11. Matraz aforado con solución NaOH al 4% m/v

El pretratamiento se realiza en una parrilla de agitación (Thermo Scientific Cimarec) a 70°C con una velocidad de agitación de 800 rpm. Las variables en este procedimiento son: tiempo (h), RL (Relación líquido, g) y RS (Relación sólido, g).



Figura 12. Parrilla de agitación

Llevado a cabo este proceso se procede a separar la fracción sólida y líquida mediante un papel filtro (8-12 μm) por 24 h.



Figura 13. Proceso de filtrado

Una vez filtrado se procede a dejar secar la fracción sólida a temperatura ambiente durante 48 h.



Figura 14. Proceso de secado

El procedimiento se repitió para 8 muestras tamizadas y 3 muestras tamizar.

Cada fracción es recolectada (figura 15), la fracción líquida es tomada para su lectura en el espectrofotómetro UV/vis y cuantificación por curva de calibración en el mismo.



Figura 15. Fracción líquida y sólida recolectada

Para llevar a cabo la determinación del porcentaje de remoción de lignina, se procede a realizar una curva de calibración a partir de un estándar de lignina alcalina (Sigma Aldrich, CAS-No: 8068-05-1) utilizando un espectrofotómetro UV/VIS. Tomando como solución madre 0.12 g/L de lignina aforada en NaOH 0.035 M (Figura 16). Para la curva de calibración se prepararon soluciones estándar con concentraciones de lignina de 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 g/l aforadas en NaOH 0.035 M. Como la lignina es fotosensible, es esencial cubrir cada vial que contiene lignina con aluminio hasta que esté listo para ser analizado con UV/Vis.

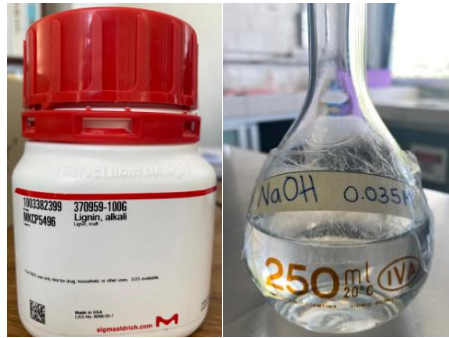


Figura 16. Lignina y solución madre (NaOH 0.035 M)

Las soluciones preparadas para la curva de calibración con el estándar de lignina se muestran en la figura 17.



Figura 17. Soluciones estándar de lignina

Posteriormente se llevó a cabo las lecturas de las fracciones líquidas obtenidas del proceso de deslignificación después de realizar el filtrado, para lo cual fue necesario realizar una dilución en proporción 1:10 con agua desionizada (Figura 18).



Figura 18. Fracciones líquidas diluidas.

Se ajustó el pH (13.886 a 4.787) de cada dilución con 4 gotas de CH_3COOH (Meyer, pureza 95-98%) y se colocó en la celda de cuarzo 1 ml de la solución más 2 ml de agua desionizada, para favorecer la calidad del espectro UV/VIS. Las lecturas se realizaron con un intervalo de longitud de onda de 200 a 800 nm, (Figura 19).



Figura 19. Espectrofotómetro PerkinElmer, Lambda 25

2.2 Medición de celulosa

2.2.1 Peso de crisoles

El primer paso que se llevó a cabo es realizar el peso constante de 2 crisoles de porcelana para eliminar la humedad y que esta no influya de manera negativa en los cálculos. Este secado se llevó a cabo en una estufa (Quincy Lab, Model 20GC Lab Oven) a 105 °C, en un intervalo de 1 h, obteniéndose 3 pesos adicionales al peso de los crisoles antes de realizar el secado.

26

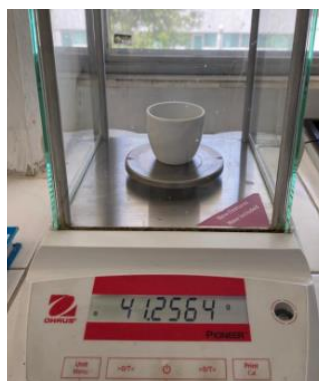


Figura 20. Peso de crisol en balanza analítica

2.2.2 Muestras

El segundo paso, fue pesar en 2 vasos de precipitados de 600 ml, 2 g de muestra en cada uno.

2.2.3 Preparación de soluciones

El tercer paso implica preparar las soluciones a utilizar. Se prepararon 2 soluciones, una alcalina y otra ácida. Para esto, teniendo en cuenta que se realiza un duplicado, se preparará una solución 1.25% v/v con H₂SO₄ (Meyer, pureza: 95 – 98 %) y 1.25% v/v con NaOH (Meyer, pureza: ≥ 97 %).

2.2.4 Primera etapa (alcalina)

La primera etapa consiste en agregar a cada uno de los vasos que contienen 2 g de cáscara, 100 ml de la solución de NaOH 1.25% v/v previamente preparada. Estos vasos se colocan en una parrilla a 300 °C, y se les agrega de 3-4 perlas de ebullición. Para generar un proceso de condensación se utilizan 2 matraces Erlenmeyer de 500 ml, a estos se le agrega hielo a la mitad del volumen, y se colocan encima de cada uno de los vasos. Con la finalidad que lo que comienza a ebullicir se condense y no se pierda la fibra. Se mantiene en ebullición por 30 minutos y el tiempo se cuenta desde que comienza a ebullicir. Es necesario tener un llenado constante de hielo, ya que este se derrite, y el agua fría contenida en el matraz es retirado con ayuda de una pipeta y una probeta.



Figura 21. Primera etapa NaOH

2.2.5 Filtrado de la muestra

Una vez pasado los 30 min, se retiran los vasos de la parrilla y se procede a filtrar. Se utiliza un colador de plástico, y como medio filtrante tela de lino, este último se coloca por encima del colador. Una vez hecho este filtrado, se recuperan las perlas de ebullición, se vacía el contenido del vaso y lo resultante que se almacena en la tela, se lava con 100 ml de agua. Terminando este lavado se recupera la fibra y se coloca nuevamente en el vaso para el siguiente paso.



Figura 22. Filtrado de la muestra

2.2.6 Segunda etapa (ácida)

Este paso es similar a la etapa con NaOH. Se agregan 100 ml de solución de H_2SO_4 1.25% v/v a cada vaso y se colocan en la parrilla, se les adicionan las perlas de ebullición y encima de estos, los matraces de hielo. El tiempo se cuenta desde que comienza la ebullición y se mantiene por 30 min.

2.2.7 Filtrado de la muestra

Nuevamente, una vez terminados los 30 min se procede a filtrar la muestra. El procedimiento es similar al filtrado con NaOH, solo que, a diferencia de este, después del lavado con agua, también es necesario lavar con 30 ml de etanol; y después de esto nuevamente se recupera la fibra y se colocan en los crisoles que se realizó el secado.



Figura 23. Fibra recuperada colocada en crisoles

2.2.8 Secado por 24 horas

El penúltimo paso consiste en colocar los crisoles con muestra en una estufa (Quincy Lab, Model 20GC Lab Oven), por 24 h a 105 °C. Una vez pasado este tiempo, se pesa y se registra el resultado, que es necesario para los cálculos. En este paso solo se contiene las fibras más minerales.



Figura 24. Secado en estufa

2.2.9 Obtención de cenizas

Como último paso, se colocan los crisoles en una mufla (Terlab, TE-M20D) a 550 °C por 2 h, con la finalidad de sólo obtener cenizas. Una vez transcurrido este tiempo, se pesan y se anotan los valores necesarios para el cálculo.



Figura 25. Cenizas obtenidas

La determinación de la fibra se calcula con la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{\text{Peso crisol después de estufa} - \text{Peso crisol después de mufla}}{\text{Peso de la muestra}}$$

2.3 Diseño de experimentos

Con el objetivo de estudiar la variabilidad de la remoción de la lignina (variable de respuesta), se eligieron tres factores operativos como variables independientes: tiempo (X_1), relación líquida (sol. NaOH 4%) (X_2) y relación sólida (cáscara de sábila malla número 20 - 60) (X_3). Otras variables como la temperatura, la concentración y la agitación, se fijan en 70 °C, NaOH 4% y 800 rpm respectivamente. Los valores naturales de cada factor y sus respectivos niveles, -1 al nivel inferior y +1 al nivel superior, se presentan en la tabla 2.

Factores variables	Dominio experimental	
	Nivel (-1)	Nivel (+1)
Tiempo (h)	2	5
Relación líquido (g)	20	50
Relación sólido (g)	1	5

Tabla 2. Dominio de factores variables

En este experimento se utilizó un diseño factorial de dos niveles, dado que sólo hay tres factores a considerar, se utilizó un diseño factorial completo de 2^3 , es decir, se requiere un total de 8 corridas experimentales para este diseño. En la Tabla 3 se presenta la matriz de experimentos, que describe el diseño presentado con una combinación de variables para cada orden de experimento, enumerado del M-1 al M-8.

Muestra	Tiempo		Relación líquido		Relación sólido	
	X ₁	h	X ₂	g	X ₃	g
M-1	-	2	-	20	-	1
M-2	+	5	-	20	-	1
M-3	-	2	+	50	-	1
M-4	+	5	+	50	-	1
M-5	-	2	-	20	+	5
M-6	+	5	-	20	+	5
M-7	-	2	+	50	+	5
M-8	+	5	+	50	+	5

Tabla 3. Plan de experimentación realizado con un diseño de experimentos 2^k.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En el presente capítulo se describen los resultados obtenidos de acuerdo a la metodología propuesta en el capítulo 2.

3.1 Proceso de deslignificación (análisis previos)

Para analizar el comportamiento de la deslignificación presente en cáscaras de sábila, se llevó a cabo un análisis previo de la muestra sin ser tamizada en malla granulométrica. Para esto, se realizó una propuesta de 5 experimentos con relación líquida-sólida (solución de NaOH al 4% y cáscara de sábila), mostrada en la tabla 4. Así como también se tomaron en cuenta condiciones de operación fijas para todos los experimentos, como el tiempo de tratamiento (2 horas), temperatura (70°C), y velocidad de agitación (800 rpm).

	Sólido Cascara (g)	Líquido Solución NaOH 4% (g)
1:10	1	10
1:15	1	15
1:20	1	20
1:25	1	25
1:30	1	30

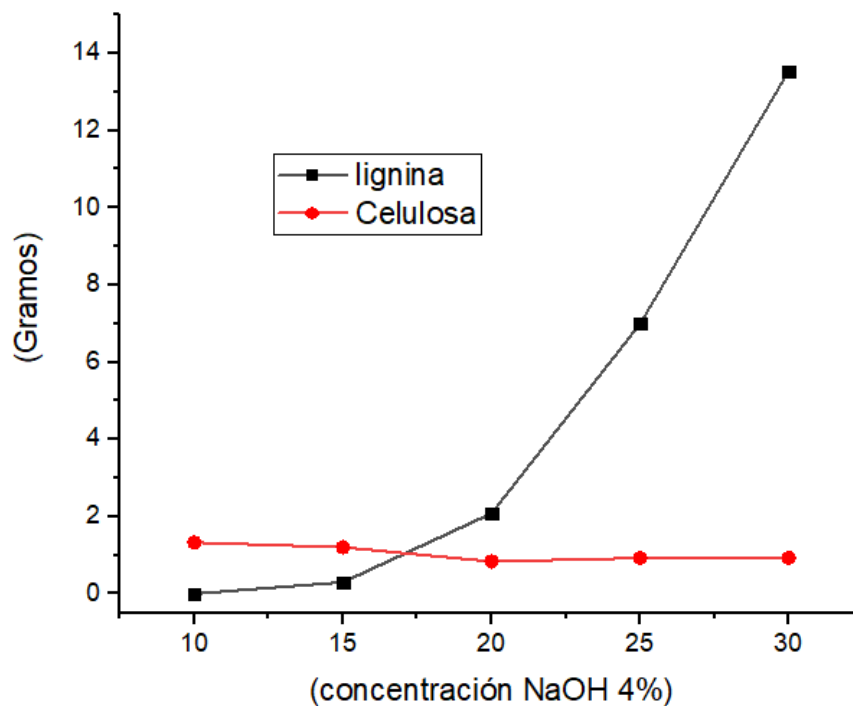
Tabla 4. Propuesta de relación líquido-sólido.

Los resultados obtenidos de las fracciones líquidas y sólidas que fueron recolectadas del proceso de deslignificación en este primer experimento se muestran en la tabla 5.

	Fracción líquida (g)	Fracción sólida (g)
1:10	1.3230	0
1:15	1.2027	0.3002
1:20	0.8323	2.0816
1:25	0.9234	6.9970
1:30	0.9307	13.5395

Tabla 5. Resultados de la cantidad de fracción recolectada.

En la gráfica 1 se muestra el comportamiento del proceso de deslignificación en base a los resultados de este primer experimento.



Gráfica 1. Gramos obtenidos de lignina (líquido café) y celulosa (residuo sólido).

Podemos observar en la gráfica 1 que al aumentar la cantidad de NaOH al 4%, no hay cambio significativo en la cantidad de celulosa obtenida, por lo anterior se requiere del diseño de experimentos para determinar las mejores condiciones de deslignificación.

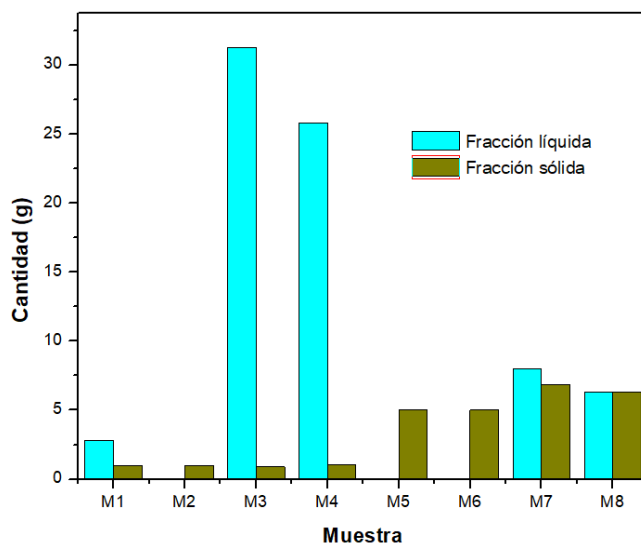
3.2 Proceso de deslignificación (Basado en el diseño de experimentos)

El diseño de experimentos se realizó de acuerdo a la propuesta descrita en el capítulo 2. Los resultados obtenidos de las fracciones líquidas y sólidas recolectadas se muestran en la tabla 6.

	Fracción líquida (g)	Fracción sólida seca (g)
M-1	2.8013	0.9775
M-2	0	1
M-3	31.2505	0.8902
M-4	25.8077	1.0626
M-5	0	5
M-6	0	5
M-7	7.9850	6.8082
M-8	6.3162	6.2771

Tabla 6. Resultados de las fracciones recolectadas.

La fracción líquida mayor fue de 31.25 g que corresponde a 2 h de agitación colocando 1 g de sólido (cáscara) en 50 g de NaOH. En el caso de las muestras M2, M5 y M6 la fracción líquida es mínima por lo que indica que esas condiciones no son adecuadas para obtener una muestra significativa para cuantificar la cantidad de lignina.



Grafica 2. Relación de la cantidad de muestra y la fracción sólida y líquida.

Podemos observar en la gráfica 2 que en la muestra M7 y M8 se obtienen una cantidad de fracción líquida similar a la fracción sólida.

3.3 Determinación de lignina mediante espectrofotometría

La espectroscopia UV/VIS es una técnica analítica adaptable y fácil de usar que proporciona los mejores resultados con respecto a las diferencias estructurales entre ligninas. La lignina puede absorber los rayos UV, ya que, contiene grupos funcionales que absorben la luz ultravioleta (UV), como fenólicos, cetonas y otros cromóforos. Por lo tanto, el valor de absorbancia más alto se puede producir a una longitud de onda de 200 a 290 nm [60]. Variando según su origen, método de extracción, etc.

Para llevar a cabo la medición de absorbancia, se realizaron las lecturas de las fracciones líquidas obtenidas en las muestras del diseño de experimentos. Estas se llevaron a cabo en el espectrofotómetro UV visible modelo PerkinElmer precisely Lambda 5 UV/VIS. Tres muestras del plan de experimentación fueron descartadas al no obtener fracciones líquidas recolectadas. Esto debido a que presentaban una mayor proporción de fracción sólida.

Se realizó un barrido del estándar de lignina en la región de 200 a 800 nm para determinar el pico máximo de adsorción. En la figura 26 se muestra el espectro obtenido. Observándose tres picos absorción a 217, 251 y 341 nm.

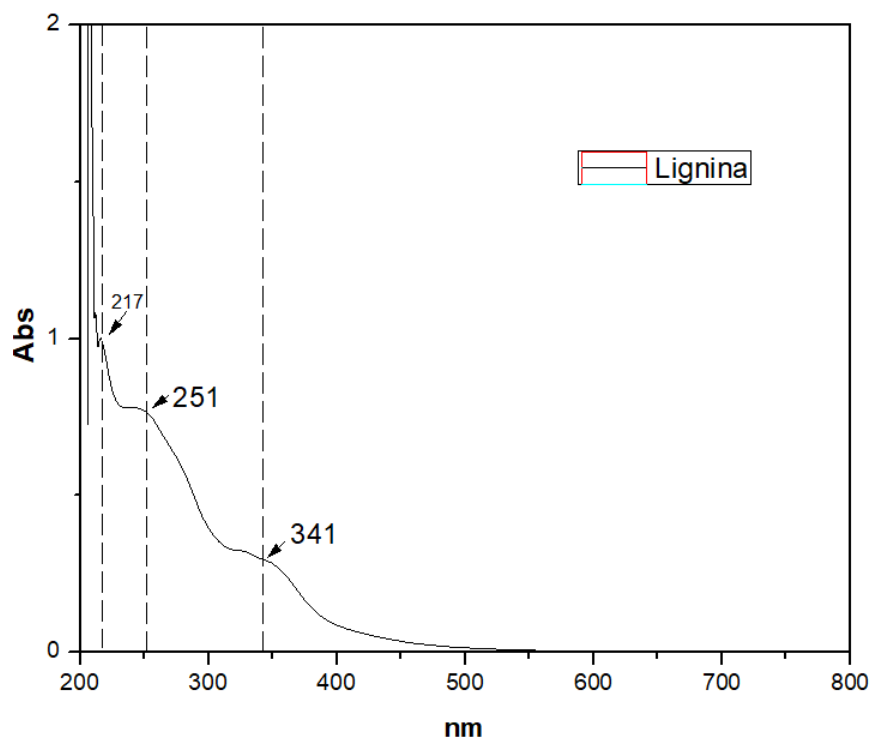
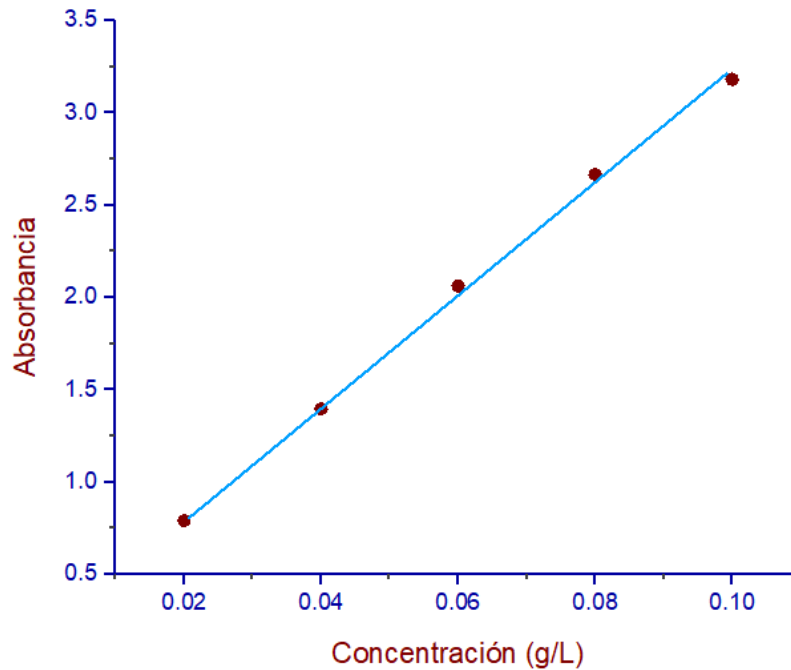


Figura 26. Espectro UV-VIS del estándar de lignina.

De acuerdo al gráfico se eligió el pico a 251 nm para construir la curva de calibración de lignina definida por la ecuación $y = 30.271x + 0.2031$.

Muestra	Lignina (g/L)	Abs	g/L		
V1	0.02	0.7896	0.01937498	m	30.271
V2	0.04	1.3968	0.03943378	b	0.2031
V3	0.06	2.0621	0.06141191	Error residual	0.046768
V4	0.08	2.6665	0.08137822	R²	0.998
V5	0.1	3.1818	0.09840111		

Tabla 7. Valores obtenidos en la curva de calibración de lignina.



Gráfica 3. Curva de calibración de lignina a 251 nm.

En la tabla se muestran los valores de las absorbancias de las muestras M1, M3, M4, M7 y M8 a 251 nm. El experimento M1 se llevó a cabo con un factor de dilución de 0.15547. Resultando M8 el experimento más favorable.

Muestra	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia promedio	Concentración de lignina (g/L)
M1	3.6242	3.6697	3.64695	0.017687402
M3	4.4527	3.5908	4.02175	0.126148789
M4	5.2801	4.0243	4.6522	0.146975653
M7	4.4838	6	5.2419	0.166456344
M8	6.4811	6	6.24055	0.199446665

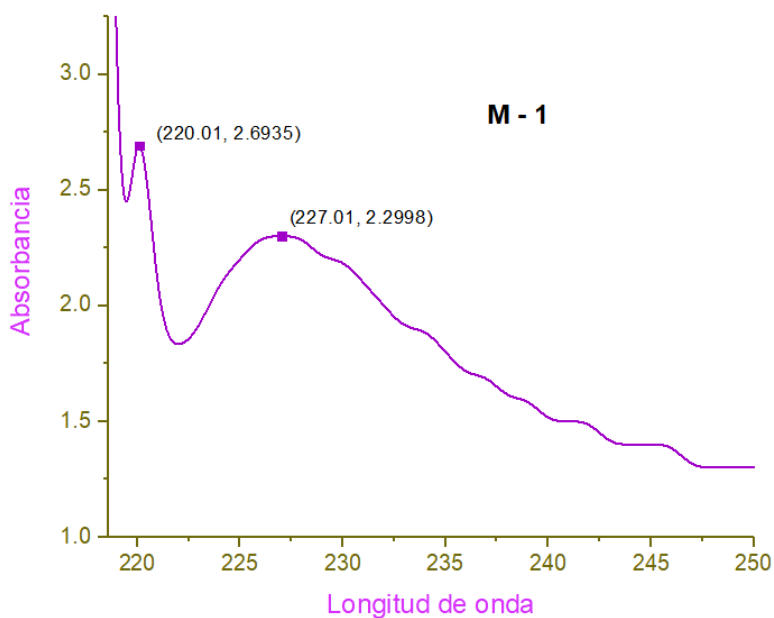
Tabla 8. Absorbancias de las muestras basadas en el diseño de experimentos.

CONCLUSIONES

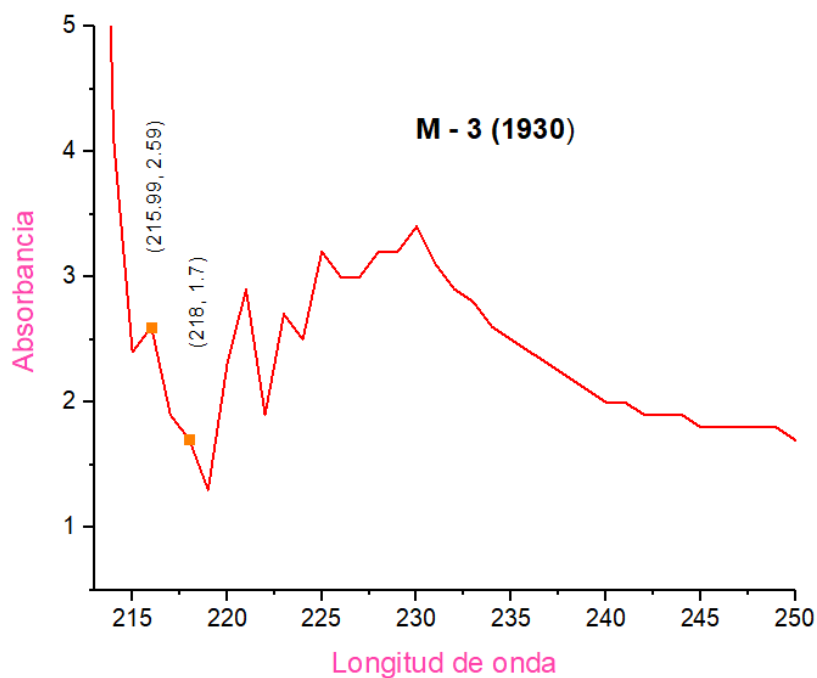
1. La relación líquido sólido es notable por lo que son una variable importante en el diseño de experimentos.
2. La técnica de espectrofotometría de UV/VIS es una técnica adecuada para medir la cantidad de lignina.
3. Los mejores resultados se obtuvieron para las muestras M7 con 0.0166 g/L y M8 con 0.199 g/L de lignina. Además, la proporción utilizada en estas muestras de 50 g de la solución de NaOH 4% y 5 g de cascara permite obtener fracciones semejantes en la cantidad obtenida en la fracción M7 (líquida 7.98 g/sólida 6.80) y M8 (líquida 7.98 g/sólido 6.80 g). Por lo anterior el tiempo de 2 y 5 h pareciera que no influyo de manera notable en los experimentos.
4. La solución de 4% de NaOH permitió extraer la lignina de a cascara de sin embargo es necesario utilizar otras concentraciones considerando la cantidad de cascara y solución.

Anexo 1

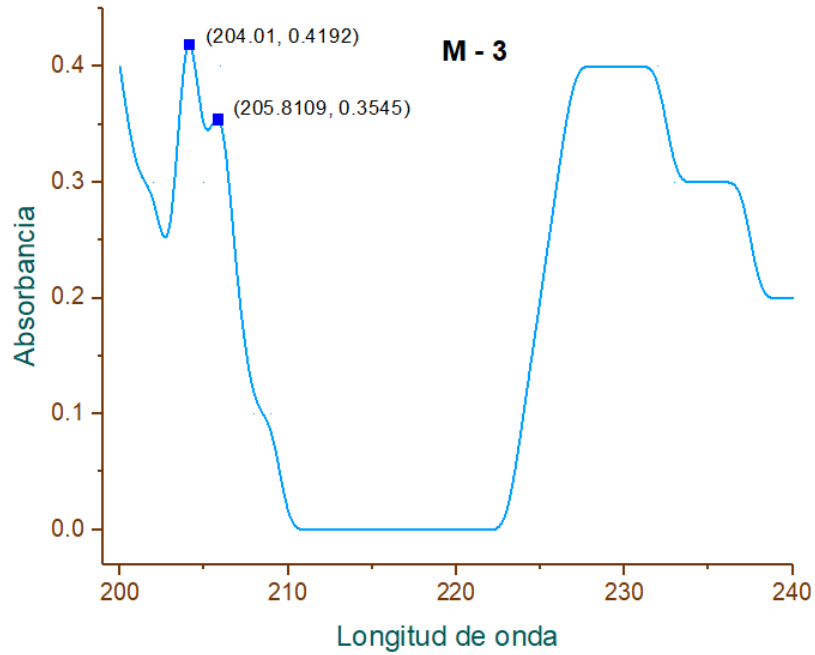
Espectros de UV-VIS de cada muestra del diseño de experimentos.



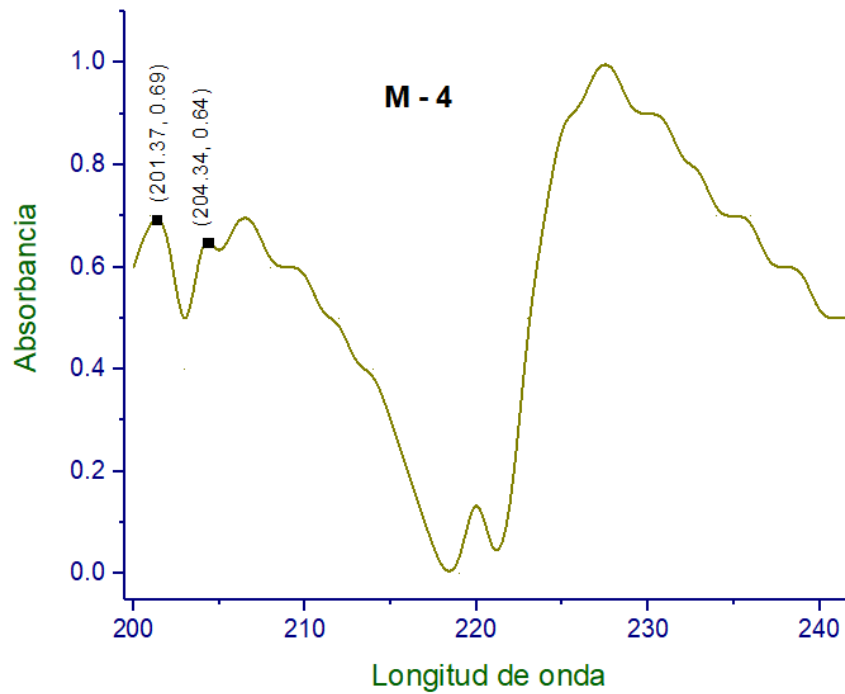
Gráfica 4. Experimento M-1 (2h, RL 20 g, RS 1 g)



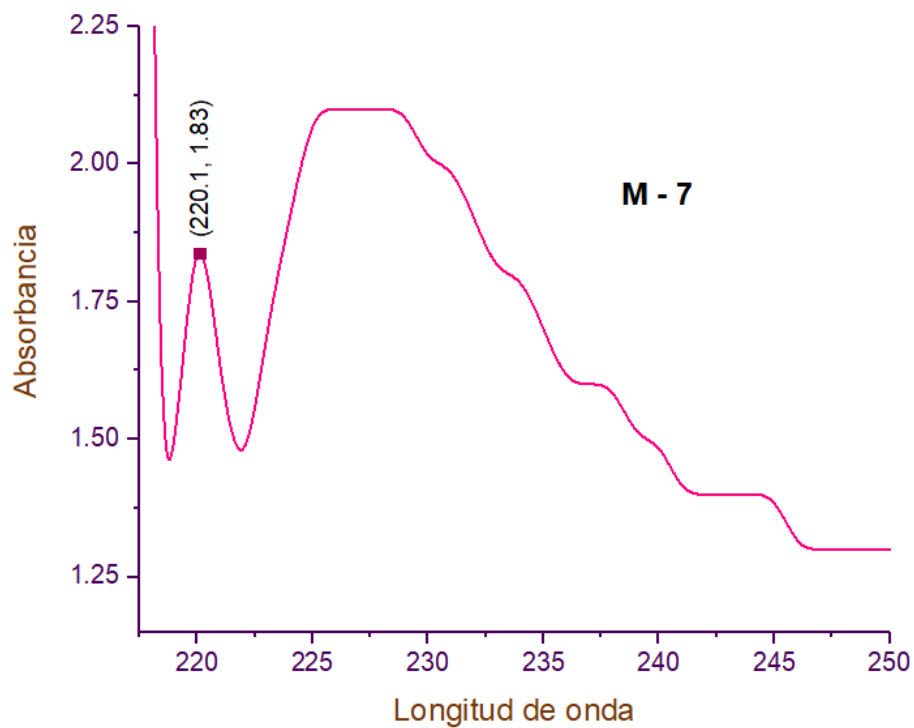
Gráfica 5. Experimento M-3 (2h, RL 50 g, RS 1 g)



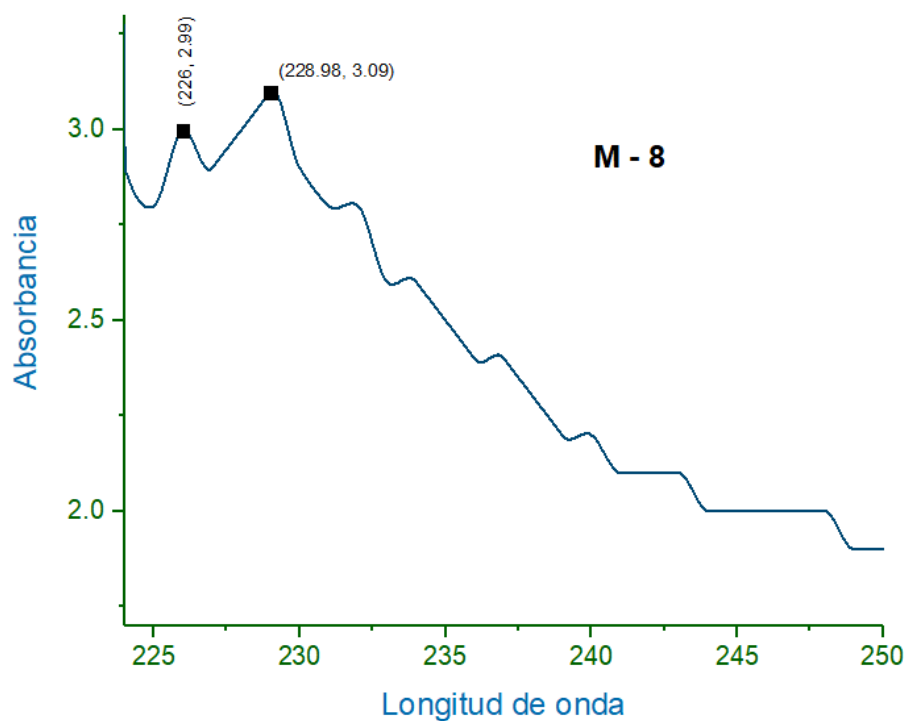
Gráfica 6. Duplicado de experimento M-3 (2h, RL 50 g, RS 1 g)



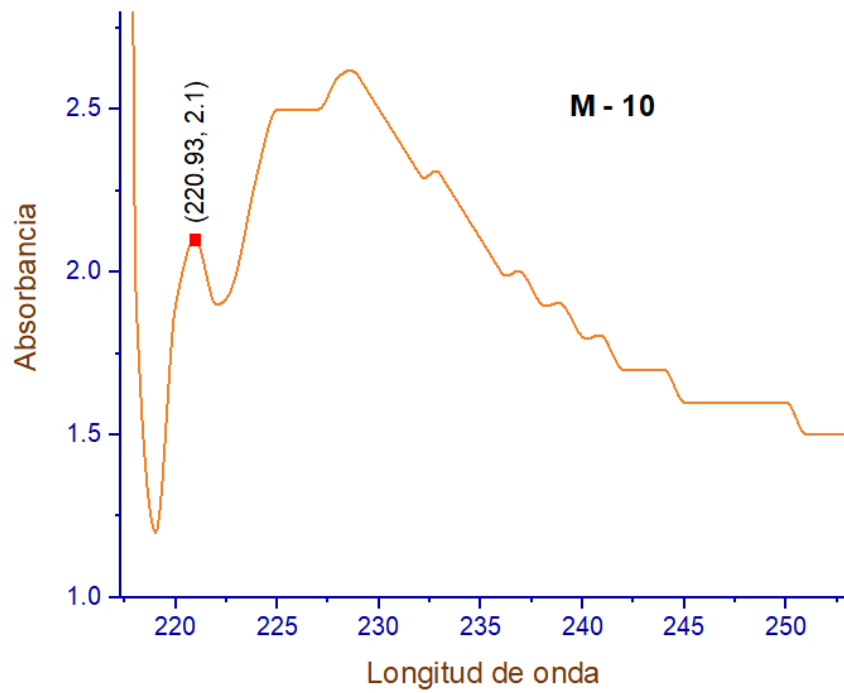
Gráfica 7. Experimento M-4 (5h, RL 50 g, RS 1 g)



Gráfica 8. Experimento M-7 (2h, RL 50 g, RS 5 g)



Gráfica 9. Experimento M-8 (5h, RL 50 g, RS 5 g)



Gráfica 10. Experimento M-10 (3h30min, RL 50 g, RS 5 g)

Bibliografía

- [1] Domínguez-Fernández, R., Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez, J. J., Welti-Chanes, J., Alvarado-González, J. S., Calderón-Domínguez, G., Garibay-Febles, V., & Gutiérrez-López, G. F. (2012). Aloe vera gel: structure, chemical composition, processing, biological activity and importance in pharmaceutical and food industry. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1), 23-43.
- [2] Kartal, F., & Özveren, U. (2021). An improved machine learning approach to estimate hemicellulose, cellulose, and lignin in biomass. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 100148. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100148>
- [3] Chávez-Sifontes, M., & Dómine, M. E. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances En Ciencias E Ingeniería*, 4(4), 15-46.
- [4] Anwar, Z., Gülfraz, M., & Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal Of Radiation Research And Applied Sciences*, 7(2), 163-173. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.02.003>
- [5] Bilal, M., & Iqbal, H. M. (2020). Ligninolytic Enzymes Mediated Ligninolysis: An Untapped Biocatalytic Potential to Deconstruct Lignocellulosic Molecules in a Sustainable Manner. *Catalysis Letters*, 150(2), 524-543. <https://doi.org/10.1007/s10562-019-03096-9>
- [6] Asgher, M., Ijaz, A., & Bilal, M. (2016). Lignocellulose-degrading enzyme production by *Pleurotus sapidus* WC 529 and its application in lignin 41(1), 26-36. <https://doi.org/10.1515/tjb-2016-0005>

- [7] Bilal, M., Nawaz, M., Iqbal, H. M., Hou, J., Mahboob, S., Al-Ghanim, K. A., & Cheng, H. (2018). Engineering Ligninolytic Consortium for Bioconversion of Lignocelluloses to Ethanol and Chemicals. *Protein And Peptide Letters*, 25(2), 108-119. <https://doi.org/10.2174/0929866525666180122105835>
- [8] Naik, G. P., Poonia, A. K., & Chaudhari, P. K. (2021). Pretreatment of lignocellulosic agricultural waste for delignification, rapid hydrolysis, and enhanced biogas production: A review. *Journal of the Indian Chemical Society*, 98(10), 1. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2021.100147>
- [9] Biswas, R., Persad, A., & Bisaria, V. S. (2014). Production of cellulolytic enzymes: In bioprocessing of renewable resources to commodity bioproducts. John Wiley & Sons, Inc., 105-132. <https://doi.org/10.1002/9781118845394.ch5>
- [10] Kaur, K., Kaur, R., & Kaur, H. (2024). A systematic review of lignocellulosic biomass for remediation of environmental pollutants. *Applied Surface Science Advances*, 19, 100547. <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2023.100547>
- [11] Tomme, P., Warren, R. A. J., & Gilkes, N. R. (1995). Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi. En *Advances in Microbial Physiology* (pp. 1-81). [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60143-5](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60143-5).
- [12] Mokhena, T.C., Sadiku, E.R., Mochane, M.J., Ray, S.S., John, M.J., Mtibe, A., 2021. Mechanical properties of cellulose nanofibril papers and their bionanocomposites: a review. *Carbohydr. Polym.* 273, 118507 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118507>
- [13] Niku-Paavola, M. L., Karhunen, E., Kantelinen, A., & Viikari, L. (1999). Thermostable endo-1, 4- β -xylanase of *Streptomyces* sp. S38. *Applied and environmental microbiology*, 65(5), 1959-1964.

- [14] Somerville, C., Bauer, Š., Brininstool, G., Facette, M. R., Hamann, T., Milne, J. L., Osborne, E., Paredes, A. R., Persson, S., Raab, T. K., Vorwerk, S., & Youngs, H. (2004). Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. *Science*, 306(5705), 2206-2211. <https://doi.org/10.1126/science.1102765>
- [15] Takahashi, Y., & Matsunaga, H. (1991). Crystal structure of native cellulose. *Macromolecules*, 24(13), 3968-3969. <https://doi.org/10.1021/ma00013a035>
- [16] Yang, W., Bai, Y., Yang, P., Luo, H., Huang, H., Meng, K., et al. (2015). A novel bifunctional GH51 exo- α -l-arabinofuranosidase/endo-xylanase from *Alicyclobacillus* sp. A4 with significant biomass-degrading capacity. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0366-0>
- [17] Kumar, R., Singh, S., & Singh, O. V. (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(5), 377–391. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0327-8>
- [18] Limayem, A., & Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 449–467. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>
- [19] Geng, W., Narron, R., Jiang, X., Pawlak, J. J., Chang, H., 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*, 26(5), 3219-3230. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02261-y>

- [20] Pasangulapati, V., Ramachandriya, K. D., Kumar, A., Wilkins, M. R., Jones, C. L., & Huhnke, R. L. (2012). Effects of cellulose, hemicellulose and lignin on thermochemical conversion characteristics of the selected biomass. *Bioresource Technology*, 114, 663-669. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.036>
- [21] Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review Of Plant Biology*, 61(1), 263-289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- [22] Walford, S. N. (2008). Sugarcane Bagasse: How easy is it to measure its constituents? *Proceedings Of The South African Sugar Technologists Association*, 81, 266-273
- [23] Wang, F., Ouyang, D., Zhou, Z., Page, S. J., Liu, D., & Zhao, X. (2021). Lignocellulosic biomass as sustainable feedstock and materials for power generation and energy storage. *Journal Of Energy Chemistry*, 57, 247-280. <https://doi.org/10.1016/j.jechem.2020.08.060>
- [24] Ročnik, T., Likozar, B., Jasiukaitytė-Grojzdek, E., & Grilc, M. (2022). Catalytic lignin valorisation by depolymerisation, hydrogenation, demethylation and hydrodeoxygenation: Mechanism, chemical reaction kinetics and transport phenomena. *Chemical Engineering Journal*, 448, 137309. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.137309>
- [25] Zhou, C., Xia, X., Lin, C., Tong, D., & Beltramini, J. (2011). Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels. *Chemical Society Reviews*, 40(11), 5588. <https://doi.org/10.1039/c1cs15124j>

- [26] Gao, Z. L., Alshehri, K., Li, Y., Qian, H., Sapsford, D. J., Cleall, P. J., & Harbottle, M. J. (2022). Advances in biological techniques for sustainable lignocellulosic waste utilization in biogas production. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 170, 112995. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112995>
- [27] Van Der Hage, E. R., Mulder, M. M., & Boon, J. J. (1993). Structural characterization of lignin polymers by temperature-resolved in-source pyrolysis—mass spectrometry and Curie-point pyrolysis—gas chromatography/mass spectrometry. *Journal Of Analytical And Applied Pyrolysis*, 25, 149-183. [https://doi.org/10.1016/0165-2370\(93\)80038-2](https://doi.org/10.1016/0165-2370(93)80038-2)
- [28] Balakshin, M., Capanema, E. A., Zhu, X., Sulaeva, I., Potthast, A., Rosenau, T., & Rojas, O. J. (2020). Spruce milled wood lignin: linear, branched or cross-linked? *Green Chemistry*, 22(13), 3985-4001. <https://doi.org/10.1039/d0gc00926a>
- [29] Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review Of Plant Biology*, 54(1), 519-546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938>
- [30] Hubbe, M. A., Rojas, O. J., Lucia, L. A., & Sain, M. (2008). Cellulosic nanocomposites. A review. *Bioresources*, 3(3), 929-980. <https://doi.org/10.15376/biores.3.3.929-980>
- [31] Nishiyama, Y., Langan, P., & Chanzy, H. (2002). Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. *Journal Of The American Chemical Society*, 124(31), 9074-9082. <https://doi.org/10.1021/ja0257319>

- [32] Narron, R., Kim, H., Chang, H., Jameel, H., & Park, S. (2016). Biomass pretreatments capable of enabling lignin valorization in a biorefinery process. *Current Opinion In Biotechnology*, 38, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.12.018>
- [33] Gatenholm, P., & Tenkanen, M. (2003). Hemicelluloses: Science and Technology. En *Acs Symposium Series*. <https://doi.org/10.1021/bk-2004-0864>
- [34] Mujtaba, M., Fraceto, L. F., Fazeli, M., Mukherjee, S., Savassa, S. M., De Medeiros, G. A., Pereira, A. D. E. S., 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. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.136815>
- [35] Gosselink, R. (2011b). Lignin as a renewable aromatic resource for the chemical industry. Wiley-VCH.
- [36] Fan, X., Liu, Z., Yang, J., & Yang, B. (2021). Pyrolysis of Lignocellulosic Biofuel Di-n-butyl Ether (DBE): Flow Reactor Experiments and Kinetic Modeling. *Energy & Fuels*, 35(17), 14077-14086. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.1c01939>
- [37] Cheng, S., Panthapulakkal, S., Sain, M., & Asiri, A. (2014). Aloe vera rind cellulose nanofibers-reinforced films. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(15), 1. <https://doi.org/10.1002/app.40592>
- [38] Rajeswari, G., Arutselvy, B., & Jacob, S. (2019). Delignification of Aloe Vera Rind by Mild Acid Associated Microwave Pretreatment to Persuade Enhanced Enzymatic Saccharification. *Waste and Biomass Valorization*, 11(11), 1–3. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00830-7>

- [39] Rajeswari, G., & Jacob, S. (2020). Saccharolysis of laccase delignified Aloe vera leaf rind and fermentation through free and immobilized yeast for ethanol production. *Journal of Food Process Engineering*, 44(2), 1–3. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13514>
- [40] Suman, S. K., Malhotra, M., Kurmi, A. K., Anand, N., Bhaskar, T., Ghosh, S., & Jain, S. L. (2022). Jute sticks biomass delignification through laccase-mediator system for enhanced saccharification and sustainable release of fermentable sugar. *Chemosphere*, 286, 131687. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131687>
- [41] Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713-3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>
- [42] Yang, B., & Wyman, C. E. (2007). Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts And Biorefining*, 2(1), 26-40. <https://doi.org/10.1002/bbb.49>
- [43] Zhao, X., Zhang, L., & Liu, D. (2012). Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts And Biorefining*, 6(5), 561-579. <https://doi.org/10.1002/bbb.1350>
- [44] Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4851-4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>

- [45] Kim, J. S., Lee, Y., & Kim, T. H. (2016). A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 199, 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>
- [46] Gunes, B., Stokes, J., Davis, P. G., Connolly, C., & Lawler, J. (2019). Pre-treatments to enhance biogas yield and quality from anaerobic digestion of whiskey distillery and brewery wastes: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 113, 109281. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109281>
- [47] Sayakulu, N. F., & Soloi, S. (2022). The Effect of Sodium Hydroxide (NaOH) Concentration on Oil Palm Empty Fruit Bunch (OPEFB) Cellulose Yield. *Journal Of Physics: Conference Series*, 2314(1), 012017. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2314/1/012017>
- [48] Kim, T. H., Kim, J. S., Sunwoo, C., & Lee, Y. (2003). Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. *Bioresource Technology*, 90(1), 39-47. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(03\)00097-x](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(03)00097-x)
- [49] Sankhla, S., Sardar, H. H., & Neogi, S. (2021). Greener extraction of highly crystalline and thermally stable cellulose micro-fibers from sugarcane bagasse for cellulose nano-fibrils preparation. *Carbohydrate Polymers*, 251, 117030. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117030>
- [50] Sánchez-Echeverri, L. A., Medina-Perilla, J. A., & Ganjian, E. (2020). Nonconventional Ca (OH)₂ Treatment of Bamboo for the Reinforcement of Cement Composites. *Materials*, 13(8), 1892. <https://doi.org/10.3390/ma13081892>
- [51] Abolore, R. S., Jaiswal, S., & Jaiswal, A. K. (2024). Green and sustainable pretreatment methods for cellulose extraction from lignocellulosic biomass and its applications: A review. *Carbohydrate Polymer Technologies And Applications*, 7, 100396. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100396>

- [52] Heitner, C., Dimmel, D. R., & Schmidt, J. A. (2016). Lignin and Lignans. En CRC Press eBooks. <https://doi.org/10.1201/ebk1574444865>
- [53] Beckham, G. T. (2018). Lignin valorization: Emerging approaches. En RSC energy and environment series. <https://doi.org/10.1039/9781788010351>
- [54] Pandey, K. K. (1999). A study of chemical structure of soft and hardwood and wood polymers by FTIR spectroscopy. Journal Of Applied Polymer Science, 71(12), 1969-1975. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4628\(19990321\)71:12](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4628(19990321)71:12)
- [55] Aktaş, A., & Şahin, H. O. (2021). A speedy method for simultaneous determination in tablet active content by NIR and UV-Vis spectrophotometry: Comparison of PLS-1 and ICA-ANN models. Gazi University Journal Of Science, 34(2), 370-379. <https://doi.org/10.35378/gujs.752042>
- [56] Kakhki, R. M., Nejati-Yazdinejad, M., & Kakeh, F. (2017). Extraction and determination of Rose Bengal in water samples by dispersive liquid–liquid microextraction coupled to UV–Vis spectrophotometry. Arabian Journal Of Chemistry, 10, S2518-S2522. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.09.020>
- [57] Camelino, S., Minchiotti, M., Bariles, R., Padilla, R. L., & Colazo, J. A. (2018). Optimización de un procedimiento para la determinación de oro mediante espectrofotometría UV/Vis. Materia-rio de Janeiro, 23(2). <https://doi.org/10.1590/s1517-707620180002.0342>
- [58] Nurani, L. H., Edityaningrum, C. A., Irnawati, I., Putri, A. R., Windarsih, A., Guntarti, A., & Rohman, A. (2023). Chemometrics-Assisted UV-Vis Spectrophotometry for Quality Control of Pharmaceuticals: A Review. Indonesian Journal Of Chemistry, 23(2), 542. <https://doi.org/10.22146/ijc.74329>
- [59] Neshkinski, E., Radeva, M., Andreev, J., Boyadzhieva, M., & Grupcheva, C. (2019). Modification of the technique for detection and follow-up of diseases

of the anterior ocular segment using the conjunctival autofluorescence method. *Bulgarian Review Of Ophthalmology*, 63(2), 42.
<https://doi.org/10.14748/bro.v63i2.6145>

[60] Sari, D. N., Rois, M. F., Widiyastuti, W., & Setyawan, H. (2022). Organosolv lignin from coconut coir as potential biomaterials for sunscreen. *AIP Conference Proceedings*. <https://doi.org/10.1063/5.0080768>

[61] Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of instrumental analysis* (7.a ed.). Cengage Learning.

[62] Almeida, A. M., Martins, I. P., Amaral, P. M. P., Borges, V. A., Pinto, L. A. S., Ionashiro, E. Y., Da Silva Mesquita, N. A., & Soares, M. H. F. B. (2019). Determination of metals present in make-up shadows by UV-VIS Spectrophotometry: a contextual experiment in higher education. *Química Nova*. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170330>

[63] Dadi, M., & Yasir, M. (2022). *Spectroscopy and Spectrophotometry: Principles and Applications for Colorimetric and Related Other Analysis*. En *IntechOpen eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.101106>

[64] Shinde, S., Meng, X., Kumar, R., & Ragauskas, A. J. (2018). Recent advances in understanding the pseudo-lignin formation in a lignocellulosic biorefinery. *Green Chemistry*, 20(10), 2192-2205.
<https://doi.org/10.1039/c8gc00353j>

[65] Theander, O., & Westerlund, E. (2015b). Quantitative Analysis of Cell Wall Components. En *ASSA, CSSA and SSSA* (pp. 83-104).
<https://doi.org/10.2134/1993.foragecellwall.c4>

[66] Van Soest, P. (1963). Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. I. Preparation of Fiber Residues of Low Nitrogen Content. *Journal Of The*

Association Of Official Agricultural Chemists, 46(5), 825-829.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/46.5.825>

[67] Montgomery, D. C. (2017). Design and analysis of experiments (9.a ed.). John Wiley & Sons.

[68] Özcan, S., Levent, S., & Can, N. Ö. (2023). Quality by design approach with design of experiment for sample preparation techniques. Advances In Sample Preparation, 7, 100079. <https://doi.org/10.1016/j.sampre.2023.100079>

[69] Yahiaoui, I., & Aissani-Benissad, F. (2010). Experimental design for copper cementation process in fixed bed reactor using two-level factorial design. Arabian Journal Of Chemistry, 3(3), 187-190.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.04.009>

[70] Noguera, J., Jiménez-Cabas, J., Álvarez, B., Caicedo-Ortiz, J., & Ruiz-Ariza, J. (2020). Analysis of Buñuelos Growth Rate Using 2k Factorial Design. Procedia Computer Science, 177, 267-275.
<https://doi.org/10.1016/j.procs.2020.10.037>