

UCUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Ingeniería Química

Estudio de la influencia del tiempo en la reacción de hidrólisis ácida para la obtención de glucosa a partir de la cáscara de cacao

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera Química

Autoras:

Valeria Elizabeth Acevedo Lazo

CI: 0106141286

Correo electrónico: myvale1@gmail.com

Paola Lisseth Once Bueno

CI: 0107091720

Correo electrónico: lissethonceb@hotmail.com

Directora:

Ing. Angélica María Vele Salto

CI: 0105616072

Cuenca, Ecuador

12-enero-2023

Resumen

El presente proyecto tuvo como objetivo principal determinar la influencia del tiempo de reacción en la etapa de hidrólisis ácida de la cáscara de cacao, para lo cual, primero se realizó un muestreo de las mazorcas de cacao en la parroquia Putucay ubicada cerca del cantón La Troncal. Posteriormente, las muestras fueron pretratadas, mediante secado y reducción de tamaño para después determinar su composición química, donde se obtuvo resultados de 21,57 % extraíbles; 27,59 % lignina; 21,65 % α -Celulosa, y 13,58 % de hemicelulosa. Luego, se llevó a cabo la reacción de hidrólisis ácida con las condiciones de 4% v/v ácido sulfúrico, a 100°C en un reactor discontinuo de mezcla perfecta, con tiempo de reacción variable en un rango de 0 a 70 minutos. Se analizó el líquido hidrolizado mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) dando como resultado la máxima concentración de glucosa de 4,40 g/L para 30 minutos. Por otra parte, mediante el método de integración por regresión lineal, se determinó que la cinética de la reacción de hidrólisis es de segundo de orden ($n = 2$) con una constante de velocidad $k = 0,0032 \text{ L g}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Finalmente, el residuo sólido de la reacción de hidrólisis se caracterizó químicamente para los tiempos dentro de la región cinética, alcanzando un contenido de lignina de 49,54% y 49,96% de holocelulosa.

Palabras clave: Cáscara de cacao. Hidrólisis. Glucosa. Lignina. Celulosa. Hemicelulosa.

Abstract

The main objective of the present project was to determine the influence of the reaction time in the acid hydrolysis stage of the cocoa shell, which it was started by sampling the cocoa cobs in the Putucay parish located near the La Troncal canton. Subsequently, the samples were pretreated, by drying and size reduction and then determining their chemical composition, where results of 21,57 % extractable, 27,59 % lignin, 21,65 % cellulose, and 13,58 % hemicellulose were obtained. Then, the acid hydrolysis reaction was performed under conditions of 4% v/v sulfuric acid, at 100°C in a discontinuous reactor of perfect mixture, with variable reaction time in the range of 0 to 70 minutes. The hydrolyzed liquid was analyzed by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) resulting in a maximum glucose concentration of 4,40 g / L for 30 minutes. On the other hand, by means of the linear regression integration method, the kinetics of the hydrolysis reaction was determined to be of second order ($n = 2$) with a velocity constant $k = 0,0032 \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Finally, the solid residue of the hydrolysis reaction was chemically characterized for times within the kinetic region, reaching a lignin content of 49,54% and 49,96% holocellulose.

Keywords: Cocoa shell. Hydrolysis. Glucose. Lignin. Cellulose. Hemicellulose.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 2 |
| ABSTRACT..... | 3 |
| ÍNDICE DE CONTENIDO | 4 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 7 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 7 |
| ÍNDICE DE GRÁFICAS..... | 7 |
| ÍNDICE DE ECUACIONES | 7 |
| ÍNDICE DE ANEXOS | 8 |
| DEDICATORIA | 13 |
| AGRADECIMIENTOS | 15 |
| INTRODUCCIÓN | 16 |
| OBJETIVOS | 18 |
| CAPÍTULO I | 19 |
| 1. CONTENIDO TEÓRICO..... | 19 |
| 1.1. Biomasa..... | 19 |
| 1.1.1. Tipos de biomasa..... | 19 |
| 1.1.2. Composición química de la biomasa..... | 20 |
| 1.1.2.1. Celulosa..... | 21 |
| 1.1.2.2. Hemicelulosa | 22 |
| 1.1.2.3. Lignina..... | 22 |
| 1.2. Cacao | 23 |
| 1.2.1. Producción de cacao en el Ecuador..... | 24 |
| 1.2.1.1. Cacao CCN-51 | 24 |
| 1.2.1.2. Cacao Nacional..... | 25 |
| 1.2.2. Disponibilidad de residuos de cacao | 25 |
| 1.2.2.1. Cáscara de cacao | 26 |
| 1.2.2.2. Composición de las cáscaras de cacao | 27 |
| 1.2.2.3. Usos de la cáscara de cacao..... | 27 |
| 1.3. Metodologías de caracterización química | 28 |

| | |
|---|----|
| 1.3.1. Normativas | 28 |
| 1.4. Pretratamiento de la biomasa..... | 29 |
| 1.4.1. Pretratamiento físico | 29 |
| 1.4.2. Pretratamiento químico | 30 |
| 1.5. Hidrólisis | 30 |
| 1.5.1. Hidrólisis ácida..... | 30 |
| 1.5.1.1. Hidrólisis ácida diluida..... | 31 |
| 1.5.1.2. Hidrólisis ácida con ácido concentrado | 31 |
| 1.5.2. Hidrólisis alcalina..... | 32 |
| 1.5.3. Hidrólisis enzimática..... | 32 |
| 1.6. Variables del proceso de hidrólisis ácida en cacao | 33 |
| 1.6.1. Temperatura | 33 |
| 1.6.2. Tiempo de reacción | 33 |
| 1.6.3. Concentración de ácido | 34 |
| 1.7. Cinética química de la reacción de hidrólisis | 35 |
| 1.8. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)..... | 36 |
| CAPÍTULO II | 37 |
| 2. METODOLOGÍA..... | 37 |
| 2.1. Muestreo de la biomasa | 37 |
| 2.2. Pretratamiento de la materia prima..... | 37 |
| 2.3. Análisis químico de la biomasa | 37 |
| 2.3.1. Eliminación de extraíbles..... | 37 |
| 2.3.2. Determinación de lignina insoluble en ácido | 38 |
| 2.3.3. Determinación de holocelulosa | 39 |
| 2.3.4. Determinación de α -celulosa..... | 40 |
| 2.3.5. Determinación de hemicelulosa | 41 |
| 2.4. Reacción de hidrólisis ácida | 41 |
| 2.5. Análisis de productos líquidos por HPLC | 42 |
| 2.6. Determinación de la cinética de reacción | 43 |
| 2.7. Análisis de residuos sólidos..... | 44 |
| CAPÍTULO III..... | 45 |

UCUENCA

| | |
|---|----|
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 45 |
| 3.1. Caracterización de la materia prima | 45 |
| 3.2. Hidrólisis ácida..... | 46 |
| 3.3. Cinética química..... | 47 |
| 3.4. Caracterización del residuo sólido de la reacción de hidrólisis..... | 49 |
| CAPÍTULO IV | 51 |
| 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 51 |
| 4.1. Conclusiones..... | 51 |
| 4.2. Recomendaciones | 52 |
| 5. BIBLIOGRAFÍA | 53 |
| 6. ANEXOS | 61 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación de la biomasa. | 20 |
| Tabla 2. Composición química de la cáscara de cacao CCN-51. | 27 |
| Tabla 3. Usos de la cáscara de cacao. | 28 |
| Tabla 4. Condiciones de operación en la reacción de hidrólisis ácida en biomasa de cacao. | 35 |
| Tabla 5. Equipo y condiciones de operación de HPLC. | 42 |
| Tabla 6. Composición química estructural de la cáscara de cacao. | 45 |
| Tabla 7. Composición química de los residuos sólidos de la hidrólisis ácida. | 50 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Fuentes de biomasa. Tomado de (BUN-CA, 2002). | 19 |
| Figura 2. Composición del material lignocelulósico. Tomado de (Casa Iza, 2018). | 21 |
| Figura 3. Estructura de la celulosa. Tomado de (García-García et al., 2013). | 22 |
| Figura 4. Estructura de la hemicelulosa. Tomado de (Bellido Díez, 2014). | 22 |
| Figura 5. Estructura de la lignina. Tomado de (Chávez-Sifontes & Domine, 2013). | 23 |
| Figura 6. Planta de cacao. Fuente: Autores. | 23 |
| Figura 7. Mazorca de cacao, variedad CCN-51. Tomado de (Anecacao, 2015). | 24 |
| Figura 8. Mazorca de cacao, variedad Nacional. Tomado de (Ministerio de Cultura y Patrimonio, 2015). | 25 |
| Figura 9. Partes de la mazorca de cacao. Tomado de (Campos-Vega et al., 2018). | 26 |
| Figura 10. Cáscara de cacao dentro del cultivo. Fuente: Autores. | 26 |
| Figura 11. Pretratamiento de biomasa lignocelulósica. Tomado de (Hosseini Koupaie et al., 2019). | 29 |
| Figura 12. Hidrólisis de materiales lignocelulósicos. Tomado de (Aguilar Rivera, 2010). | 31 |

ÍNDICE DE GRÁFICAS

| | |
|--|----|
| Gráfica 1. Gráfica temperatura vs tiempo para un proceso hidrotérmico. | 34 |
| Gráfica 2. Concentración de glucosa obtenida luego la reacción hidrólisis de cáscara de cacao. | 46 |
| Gráfica 3. Regresión lineal, $n=0$ | 47 |
| Gráfica 4. Regresión lineal, $n=1$ | 48 |
| Gráfica 5. Regresión lineal, $n=2$ | 48 |
| Gráfica 6. Gráfica de pesos de residuo sólido de la hidrólisis ácida. | 49 |

ÍNDICE DE ECUACIONES

| | |
|--|----|
| Ecuación 1. Hidrólisis de la celulosa. | 36 |
| Ecuación 2. Porcentaje de extractivos. | 38 |

| | |
|--|----|
| Ecuación 3. Porcentaje de lignina..... | 39 |
| Ecuación 4. Porcentaje de holocelulosa..... | 40 |
| Ecuación 5. Porcentaje de α -celulosa..... | 41 |
| Ecuación 6. Porcentaje de hemicelulosa..... | 41 |
| Ecuación 7. Ecuación de ley de velocidad de integrada..... | 43 |
| Ecuación 8. Ecuación de ley de velocidad de reacción..... | 43 |
| Ecuación 9. Ecuación de concentración de glucosa, n=0..... | 43 |
| Ecuación 10. Ecuación de concentración de glucosa, n=1..... | 43 |
| Ecuación 11. Ecuación de concentración de glucosa, n=2..... | 43 |
| Ecuación 12. Ecuación de la recta para n=2..... | 49 |

ÍNDICE DE ANEXOS

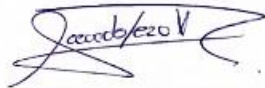
| | |
|---|----|
| Anexo 1. Resultados análisis de cromatografía líquida..... | 61 |
| Anexo 2. Coeficientes de variación en duplicados..... | 65 |
| Anexo 3. Registro fotográfico..... | 66 |

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Valeria Elizabeth Acevedo Lazo en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Estudio de la influencia del tiempo en la reacción de hidrólisis ácida para la obtención de glucosa a partir de la cáscara de cacao", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 12 de enero de 2023



Valeria Elizabeth Acevedo Lazo

C.I: 0106141286

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Paola Lisseth Once Bueno en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Estudio de la influencia del tiempo en la reacción de hidrólisis ácida para la obtención de glucosa a partir de la cáscara de cacao", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 12 de enero de 2023



Paola Lisseth Once Bueno

C.I: 0107091720

Cláusula de Propiedad Intelectual

Valeria Elizabeth Acevedo Lazo, autora del trabajo de titulación "Estudio de la influencia del tiempo en la reacción de hidrólisis ácida para la obtención de glucosa a partir de la cáscara de cacao", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 12 de enero de 2023



Valeria Elizabeth Acevedo Lazo

C.I: 0106141286

Cláusula de Propiedad Intelectual

Paola Lisseth Once Bueno, autora del trabajo de titulación "Estudio de la influencia del tiempo en la reacción de hidrólisis ácida para la obtención de glucosa a partir de la cáscara de cacao", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 12 de enero de 2023



Paola Lisseth Once Bueno

C.I: 0107091720

DEDICATORIA

Al finalizar esta etapa de mi vida, quiero dedicar este logro a Dios y a varias personas que han formado parte de este trayecto. En primer lugar, a mi mamá María Lazo, por su apoyo incondicional en todo momento y por nunca perder la Fe en mis capacidades, que siempre fue mi guía, pilar y consejera para no abandonar este camino, porque a pesar de las dificultades, siempre ha hecho grandes esfuerzos por darme los mejores valores y educación para salir adelante.

A mi padre, Luis Acevedo, quien ha sido una parte fundamental de mi vida y siempre ha estado brindándome su apoyo económico y moral, por cada día esforzarse para darme la mejor educación.

A mi hermanos y sobrinas, Diana, Lisette, Christian, Camila y Monserrath que han estado presentes de una u otra manera en esta travesía, por siempre alentarme cada día a seguir mis sueños.

A mi amiga y compañera de tesis Paola, quien me ha acompañado desde el inicio de la carrera y con quien culmino la misma, por las alegrías y tristezas que hemos pasado juntas.

A demás familia y amigos que han hecho parte de mi formación tanto personal como académica.

A mis mascotas y fieles compañeras, Juana y Sasha que me regalan todo su amor y apoyo emocional sin esperar nada a cambio, por haber sido mi consuelo y compañía todos los días de mi vida, sin ustedes no hubiera alcanzado esta meta por esto les dedico este logro con todo mi amor y orgullo.

*Hasta que no hayas amado a un animal, una parte de tu alma permanecerá dormida.
Anatole France*

Valeria

DEDICATORIA

Este logro lo dedico con amor a mis padres Anita y Eugenio, ustedes que han sido mi pilar de vida, permitiéndome seguir mis sueños, aconsejándome y contando siempre con su apoyo incondicional. A ti papá que siempre te has esforzado y trabajado duro para que no nos falte nada; por creer en mí, querer que terminara esta etapa y consiguiera este logro para mi vida, A ti mamá por tu amor y apoyo en todas mis decisiones, has sido una mujer admirable por tu fortaleza al pasar por difíciles situaciones, me has enseñado muchas cosas y has estado siempre para mí en todo momento.

A mi hermano Andrés, quien ha cuidado siempre de mi como el mejor hermano mayor que pueda haber; a ti por siempre creer en mí y ha sido mi apoyo en todo momento y a pesar de la distancia siempre confiaste y me alentaste para que pudiera conseguir esta meta en mi vida y ser una mejor persona.

A Pablo Abelardo, el amor de mi vida, quien ha sido compañero, confidente, mejor amigo y más, por muchos años ya, en los cuales hemos compartido momentos felices y tristes, momentos de decepción, pero también muchos otros de orgullo que nos inspiran a seguir adelante compartiendo sueños y experiencia; a usted por ser mi gran apoyo desde el inicio enseñándome a confiar en mí siempre en todos los aspectos, para seguir adelante y conseguir este logro.

Con todo mi corazón a mi hermanito Joelito, a ti que llegaste a ser el soporte de la familia alegrando nuestros días con tu inocencia desde el día en que naciste, tú quién es y ha sido mi fuerza para seguir adelante y terminar esta meta en mi vida, enseñándote mi pequeño valiente que con esfuerzo y constancia todo se puede lograr.

A Valeria, Daniela y Dania, mis mejores amigas, desde el inicio siempre; a ustedes por su apoyo, cariño y confianza siempre y sobre todo en este último año que para mí ha estado lleno de grandes cambios, gracias por estar alentándome a seguir adelante para culminar y lograr esta meta en mi vida.

A mis amigos y familia, con amor y cariño.

Paola

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecemos a Dios, por permitirnos culminar esta etapa, darnos salud y vida para seguir adelante a pesar de las adversidades.

Al mismo tiempo agradecemos a nuestros padres y hermanos por su amor y apoyo incondicional a lo largo de nuestra vida estudiantil.

A nuestra directora, Ing. Angélica Vele, por su tiempo, apoyo, dedicación, paciencia y guía para culminar este proyecto de titulación. Gracias de todo corazón.

A la Ing. Mónica Abril por su predisposición, orientación y confianza para el uso de las instalaciones y equipos del Laboratorio de Ingeniería de las Reacciones Químicas, Catálisis y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Cuenca.

Finalmente, a nuestros amigos y demás familia que han formado parte de este trayecto. Agradecemos sus consejos, apoyo y cariño.

Valeria y Paola

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, según su Atlas Bioenergético la generación de biomasa residual de cacao para el año 2014 se estimó en 2 015 353 t/año, que en su mayoría no son aprovechados o tienen una disposición final inadecuada quedando acumulados en el cultivo produciendo serios problemas ambientales a nivel del suelo por acumulación de materiales o propagación de patógenos al cultivo (ESIN Consultora S.A., 2014; Ortiz & Álvarez, 2015).

Por esta razón el manejo de los residuos del cacao representa un gran desafío para encontrar una aplicación industrial, por lo tanto el estudio de su estructura lignocelulósica es importante ya que el contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa podrían ser aprovechados para la generación de biocombustibles, alimentos para animales, producción de papel, entre otros (Oddoye et al., 2013). Para lo cual, previo a la caracterización química, se eliminan los extraíbles como nitritos, nitratos, proteínas, sacarosa, cenizas, clorofila y ceras mediante el uso de solventes como agua y etanol, debido a que las normativas requieren de esta etapa para evitar interferencias en el análisis estructural de la biomasa.

En la actualidad existen diversos procesos para la obtención de azúcares fermentables, entre ellos la hidrólisis ácida, básica, enzimática e hidrotérmica, siendo la hidrólisis ácida un método bastante utilizado por la baja generación de subproductos inhibidores, menor impacto ambiental y un mayor rendimiento (Barba et al., 2013; Díaz-Oviedo et al., 2022). Como resultado de este proceso de hidrólisis se produce una parte líquida que contiene una mezcla de monosacáridos entre ellos la glucosa que se emplea como materia prima para el proceso de fermentación y obtención de biocombustibles líquidos, por otra parte, también se obtiene una parte sólida que se desecha como producto de la reacción, por lo cual es necesario el análisis de dicho sólido para conocer su contenido lignocelulósico y su posible aplicación a futuro. Finalmente, la relación entre la concentración de glucosa obtenida y el tiempo de reacción se analiza a través del estudio de la cinética química.

El objetivo general del presente trabajo de investigación es determinar el tiempo óptimo para la obtención de glucosa mediante hidrólisis ácida a partir de la cáscara de cacao, por lo que se procederá a eliminar extraíbles antes de aplicar los métodos de caracterización química a la biomasa. En la hidrólisis ácida se utilizarán condiciones de operación relacionadas al

UCUENCA

tiempo, concentración del ácido y temperatura y luego se realiza el estudio de la cinética de reacción así como el análisis de los productos de hidrólisis.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar la influencia del tiempo en la reacción de hidrólisis ácida para la obtención de glucosa a partir de la cáscara de cacao.

Objetivos Específicos

- Caracterizar químicamente la cáscara de cacao y los residuos sólidos de la reacción.
- Determinar el contenido de glucosa mediante cromatografía líquida.
- Determinar la cinética de reacción de la hidrólisis ácida en función de la variación del tiempo.

CAPÍTULO I

1. CONTENIDO TEÓRICO

1.1. Biomasa

La biomasa se define como la fracción biodegradable de los productos y residuos de origen biológico procedentes de actividades agrarias y forestales, así como de residuos industriales y municipales (Madrid Vicente, 2012). Posee un potencial de uso como fuente de energía renovable, que se puede aprovechar directa o indirectamente de estos recursos biológicos, ya que su fuente de energía deriva primero del sol en donde las plantas absorben energía del sol a través de la fotosíntesis y la luz solar proporciona a las plantas la energía que necesitan para convertir el CO₂ y el agua, en oxígeno y azúcares (carbohidratos) suministrando energía a las plantas y consecuentemente a los animales que consumen estas plantas (Madrid Vicente, 2012; Turgeon & Morse, 2022).

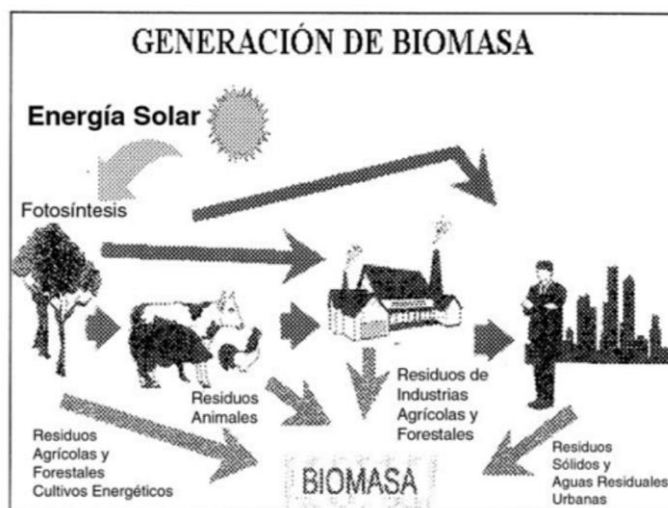


Figura 1. Fuentes de biomasa. Tomado de (BUN-CA, 2002).

1.1.1. Tipos de biomasa

Debido a las diferencias sustanciales en cuanto a variedad y cantidad de biomasa, además de sus diferentes características composicionales, no existe una clasificación única de la biomasa por lo que pueden agruparse de diferentes maneras según su finalidad y ámbito (Tursi, 2019). En la tabla 1 se describe la clasificación más usada tomando como criterio su origen.

Tabla 1. Clasificación de la biomasa.

| Biomasa según su origen | Subgrupos de biomasa | Variedades y especies |
|-------------------------|----------------------------|--|
| Biomasa natural | Biomasa Terrestre | <ul style="list-style-type: none"> ● Biomasa forestal ● Hierbas y flores ● Plantaciones con fines energéticos |
| | Biomasa acuática | <ul style="list-style-type: none"> ● Algas marinas o de agua dulce ● Otras plantas acuáticas |
| Biomasa residual | Residuos municipales | <ul style="list-style-type: none"> ● Residuos sólidos municipales ● Aguas servidas ● Gas producido en rellenos municipales |
| | Residuos agrícolas sólidos | <ul style="list-style-type: none"> ● Residuos ganaderos ● Residuos de cosechas agrícolas |
| | Residuos industriales | <ul style="list-style-type: none"> ● Residuos de la industria de muebles de madera ● Residuos de demolición de estructuras de madera ● Aceites y grasas vegetales |

Nota: Esta tabla presenta la clasificación y subclasificación de la biomasa según su origen. Tomado de (Peláez Samaniego & Espinoza Abad, 2015).

1.1.2. Composición química de la biomasa

La composición de la biomasa es diversa, esto debido a su origen, por ejemplo, los residuos de origen vegetal están compuestos principalmente de dos polímeros carbohidratos, celulosa y hemicelulosa, así como de un polímero aromático llamado lignina, y de otros compuestos que se encuentran en menor cantidad, mientras que la biomasa de origen animal es rica en proteínas y los cereales se componen principalmente de almidón. Las diferentes estructuras químicas obviamente darán como resultado diferentes propiedades químicas (Hosseini Koupaie et al., 2019; Tursi, 2019).

La expresión ‘biomasa lignocelulósica’ es empleada para describir a los residuos constituidos por celulosa, hemicelulosa y lignina que se encuentra en mayor proporción en plantas maderables y no maderables (Peláez Samaniego & Espinoza Abad, 2015); de este grupo se

excluye a la biomasa formada en su mayoría por almidones, azúcares y proteínas, debido a que las propiedades químicas de los componentes de la biomasa lignocelulósica hacen de ella un sustrato de enorme valor biotecnológico (Casa Iza, 2018).

De manera general, la estructura básica de la biomasa se compone principalmente de celulosa (30 - 60 %), hemicelulosa (20 - 40 %) y lignina (10 - 25 %), junto con cantidades más pequeñas de otros compuestos orgánicos e inorgánicos como proteínas, lípidos y otros extractivos. Es importante recalcar que las cantidades de estos compuestos no solo varía entre diferentes especies sino que también puede variar por las condiciones de crecimiento y maduración. (Hosseini Koupaie et al., 2019; Sawatdeenarunat et al., 2015).

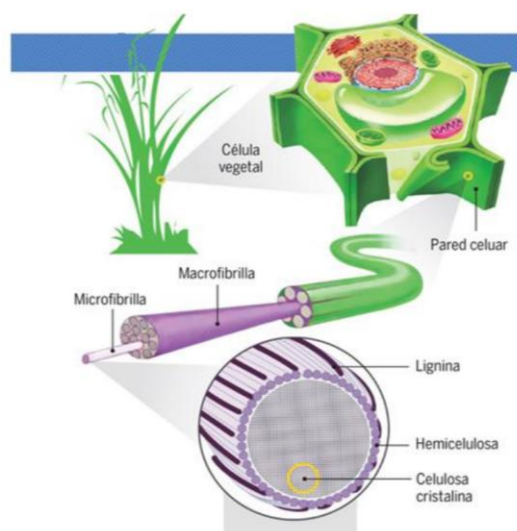


Figura 2. Composición del material lignocelulósico. Tomado de (Casa Iza, 2018).

1.1.2.1. Celulosa

La celulosa ($C_6H_{12}O_6$)_n es el compuesto orgánico más abundante que se puede encontrar en la naturaleza y posee una función estructural en las paredes celulares de las plantas, es un polisacárido de alto peso molecular lineal formado por subunidades de D-glucosa unidos por enlaces β -1,4-glucosídicos. Este tipo de enlace covalente hace que las moléculas sean más estables y rígidas, por otro lado las moléculas de celulosa están unidas por enlaces de hidrógeno y tienen diferentes orientaciones dando como resultado distintos niveles de cristalinidad, estas características de la celulosa influyen directamente en la insolubilidad de la molécula dificultando su degradación o digestión (Hosseini Koupaie et al., 2019).

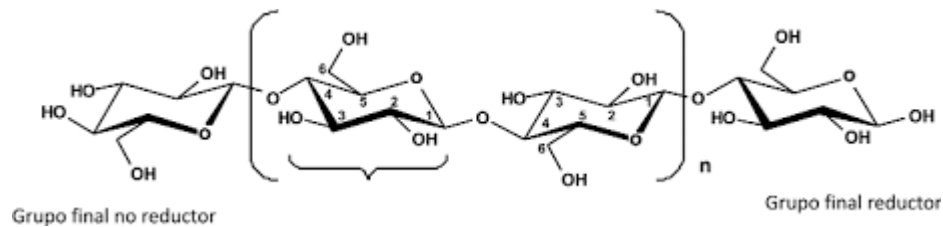


Figura 3. Estructura de la celulosa. Tomado de (García-García et al., 2013).

1.1.2.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa también forma parte de los principales constituyentes de las paredes celulares de las plantas sin embargo el contenido y estructura son diferentes según el tipo de planta. En general la hemicelulosa es un heteropolisacárido altamente ramificado que contiene diferentes polisacáridos que incluyen pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, galactosa y manosa) y ácidos de azúcar. La naturaleza ramificada de la hemicelulosa le permite formar enlaces fuertes tanto con la celulosa como la lignina aumentando la rigidez del material lignocelulósico (Hosseini Koupaie et al., 2019; Tursi, 2019).

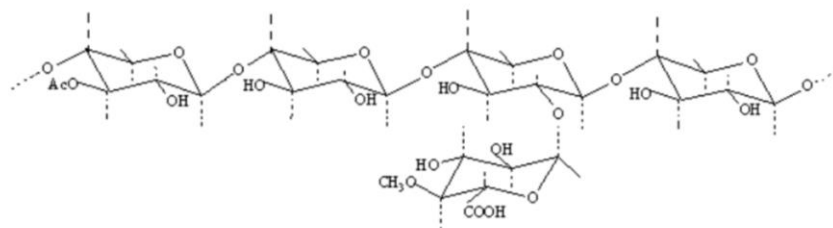


Figura 4. Estructura de la hemicelulosa. Tomado de (Bellido Díez, 2014).

1.1.2.3. Lignina

La lignina es una parte esencial de la estructura de la biomasa ya que tiene la función de brindar soporte mecánico e impermeabilidad, actuando como material cementante que une la celulosa y la hemicelulosa para formar la estructura tridimensional rígida de la pared celular vegetal (Hosseini Koupaie et al., 2019). Es un polímero complejo y grande formado por unidades de fenilpropano, es insoluble en agua y ópticamente inerte. Tales propiedades convierten a la lignina en el componente más resistente de la biomasa a la degradación biológica y química, debido a esto posee poco valor para la producción de bioenergía, a pesar

de ser el segundo polímero más abundante en la tierra (Sawatdeenarunat et al., 2015; Tursi, 2019).

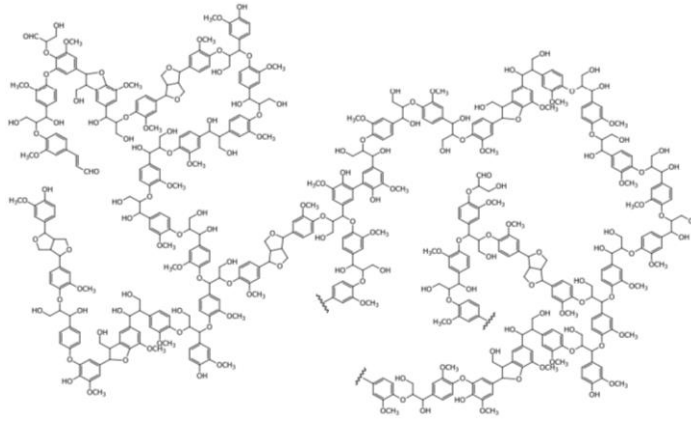


Figura 5. Estructura de la lignina. Tomado de (Chávez-Sifontes & Domine, 2013).

1.2. Cacao

El cacao pertenece a la familia de las esterculiáceas y su nombre botánico es *Theobroma Cacao L*; la planta de cacao es de tamaño mediano, clasificado como árbol tropical puesto que crece en climas cálidos y húmedos; posee flores pequeñas en sus ramas y produce una mazorca que contiene granos cubiertos de una pulpa rica en azúcares (León Villamar et al., 2016).



Figura 6. Planta de cacao. Fuente: Autores.

1.2.1. Producción de cacao en el Ecuador

El cacao es uno de los principales productos de exportación de Ecuador, situando a este dentro de los ocho principales países productores de cacao a nivel mundial (Campos-Vega et al., 2018). El árbol de cacao está presente en climas tropicales y húmedos a una altitud de hasta 500 m.s.n.m por lo tanto los cultivos de cacao se sitúan mayormente en las regiones Costa y Amazonía del Ecuador. De acuerdo con estadísticas reportadas por ESPAC (INEC, 2021), en el año 2020, la superficie plantada de cacao a nivel nacional fue de 590 579 hectáreas, donde la provincia que mayor producción concentra es Los Ríos con un 28,36 %, seguida de Guayas, Manabí y otras provincias.

Ecuador posee una larga tradición en producción y exportación del cacao y hoy en día los cultivos de cacao dentro del país se centran en dos variedades: el cacao CCN-51 y el denominado Cacao Nacional que han sido reconocidas a nivel internacional. Hasta el momento la relación de producción entre estas dos variedades en las exportaciones ecuatorianas es de: 72 % Cacao CCN-51 y 28 % Cacao Nacional (Anecacao, 2015).

1.2.1.1. Cacao CCN-51

El CCN-51 (Colección Castro Naranjal) es un cacao clonado de origen ecuatoriano, considerado ordinario y se caracteriza por su productividad y resistencia a enfermedades. (León Villamar et al., 2016). La mazorca de esta variedad presenta un color rojizo en su estado de crecimiento y en su estado de madurez cambia a rojizo anaranjado; su tamaño es mayor a comparación de la variedad Nacional haciendo que su cáscara sea más de la mitad de su peso total (Benalcázar Bassante, 2018).



Figura 7. Mazorca de cacao, variedad CCN-51. Tomado de (Anecacao, 2015).

1.2.1.2. Cacao Nacional

El Cacao Nacional también conocido como Cacao Fino de Aroma de Ecuador es un caso único por su calidad, el cacao nacional ecuatoriano “es un forastero autóctono del bosque húmedo ecuatoriano” la mazorca es de color amarillo y posee un sabor y aroma único. Esta variedad de cacao está dirigida a un mercado especializado ya que este producto se destina a la producción de chocolates de alta calidad (León Villamar et al., 2016).



Figura 8. Mazorca de cacao, variedad Nacional. Tomado de (Ministerio de Cultura y Patrimonio, 2015).

1.2.2. Disponibilidad de residuos de cacao

Ecuador es un país productor y exportador de cacao considerándose al mismo como el tercer producto agrícola en importancia después del banano y las flores. En el año 2020 las exportaciones de cacao ecuatoriano crecieron en un 11 % en comparación a 2019, teniendo una producción a nivel nacional y exportación hasta junio del mismo año de 23 206 toneladas, esta cifra es proporcionada por Anecacao (Asociación Nacional de exportadores de Cacao - Ecuador), una organización que trabaja para el desarrollo del sector productor y exportador del cacao ecuatoriano y mantiene el 90 % de todo el cacao que se exporta (Cobos, 2021; Arosemena, 2020).

En base a los datos de producción y exportación del cacao dentro del país, actualmente en el Ecuador los cultivos de cacao generan grandes volúmenes de residuos tal como lo describe su Atlas Bioenergético, en donde, para el año 2014 se generó un estimado de 2 015 353 t/año de biomásas (ESIN Consultora S.A., 2014). El grano de cacao constituye un tercio del peso de la fruta, convirtiendo a la cáscara de cacao en el principal subproducto de la industria

cacaotera ya que constituye entre el 67 % y el 76 % del peso de la fruta de cacao como se indica en la figura 9 (Campos-Vega et al., 2018).

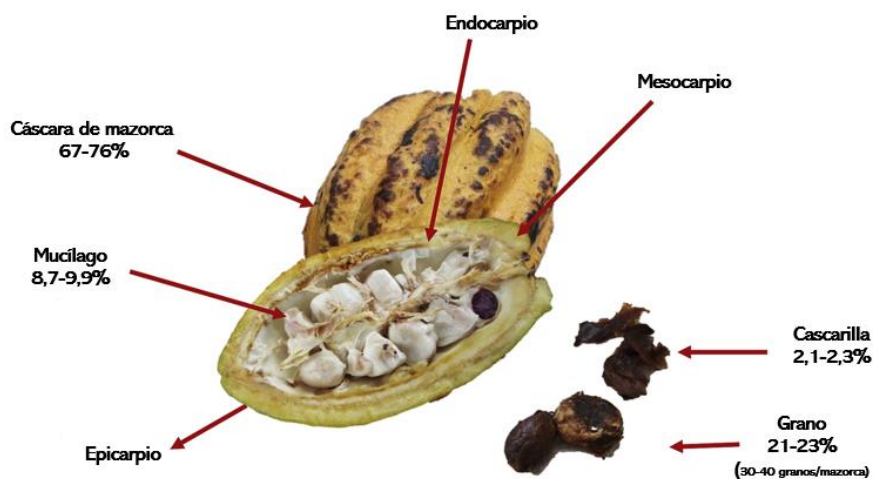


Figura 9. Partes de la mazorca de cacao. Tomado de (Campos-Vega et al., 2018).

1.2.2.1. Cáscara de cacao

La cáscara de cacao puede describirse como el material sobrante de la mazorca de la fruta de cacao madura, después de que se hayan eliminado los granos de cacao húmedos y el mucílago (Oddoye et al., 2013). En la mayoría de los casos, estas cáscaras se desechan y se consideran un desecho/residuo indeseable para la industria cacaotera. Normalmente, se dejan pudrir en la plantación de cacao lo que puede causar problemas ambientales y, además de producir malos olores, las cáscaras en descomposición pueden propagar enfermedades al cultivo (Vriesmann et al., 2011).



Figura 10. Cáscara de cacao dentro del cultivo. Fuente: Autores.

1.2.2.2. Composición de las cáscaras de cacao

Debido a la gran cantidad de residuos que se obtiene en la cosecha del cacao, para el desarrollo de cualquier investigación es importante conocer la composición química, por lo cual en la tabla 2, se resumen algunos resultados de esta biomasa como materia lignocelulósica.

Tabla 2. Composición química de la cáscara de cacao CCN-51.

| Componente | (%) | (%) |
|-------------------|-----------------------|----------------------|
| Cenizas | 9,14 | 12,04 |
| Lignina | 14 | 33,90 |
| Celulosa | 35 | 29,07 |
| Hemicelulosa | 11 | 2,97 |
| Referencia | (Oddoye et al., 2013) | (Loayza Calva, 2020) |

1.2.2.3. Usos de la cáscara de cacao

La cáscara de cacao representa una oportunidad renovable ambiental importante, desafiante y económica, ya que se generan diez toneladas de cáscara de cacao húmedo por cada tonelada de granos de cacao secos (Campos-Vega et al., 2018). Este subproducto tiene diferentes usos en el mundo y una de la más importante es en la producción de energía en forma de combustible ya que esto significa una contribución valiosa a la conservación de recursos fósiles no renovables, así como el desarrollo de fuentes de energía independientes (Salazar, 2016).

En la tabla 3 se describen algunas de las otras aplicaciones que se estudian de la cáscara de cacao.

Tabla 3. Usos de la cáscara de cacao.

| Subproductos y usos de la cáscara de cacao | Descripción |
|---|---|
| Ingrediente de alimentos para animales | Se estudiaron mediante ensayos con aves y ganado la incorporación a los alimentos de estos animales, raciones de cáscara de cacao. |
| Mejoramiento del valor alimenticio | Se trata de mejorar el valor alimenticio de la cáscara de cacao con la adición de álcalis y enzimas. |
| Alimentación húmeda de cáscara de cacao | Con el objetivo de disminuir tiempos y costos de secado de la cáscara se estudia la posibilidad de alimentar con una mezcla de cáscara húmeda y fresca. |
| Fuente de álcali para la fabricación de jabón | Luego de un análisis a la cáscara se ha obtenido que este contiene porcentajes significativos de potasa que se puede usar como álcali para la fabricación de jabón. |
| Fertilizante potásico | La ceniza de cáscara de cacao es un fertilizante rico en potasio mediante la adición de almidón. |

Nota: Adaptado de (Oddoye et al., 2013).

1.3. Metodologías de caracterización química

La caracterización es una etapa fundamental para el uso de cualquier biomasa debido a que cada una posee características físicas y químicas diferentes, es importante mencionar que existen un grupo de compuestos que se conocen como extraíbles que pueden influir en las técnicas de análisis de caracterización. Estudios realizados indican la importancia de la remoción del material extraíble, evitando interferencias en los análisis posteriores. Dentro de este grupo de compuestos se incluyen, entre otros, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, alcoholes, fenoles, aldehídos, cetonas, ácidos alifáticos, ceras, glicéridos y compuestos orgánicos (Álvarez Rodríguez, 2013).

1.3.1. Normativas

- Para la remoción de los extraíbles de la biomasa (cáscara de cacao), se emplea la metodología descrita en la norma NREL/TP; 510-42619.

- Para la determinación de los componentes químicos, se emplea la norma TAPPI 222 om-02 para la lignina y en la norma TAPPI T-203 m-58 para α -celulosa.
- El análisis del contenido de hemicelulosa, se efectúa a través de la determinación de holocelulosa, y se emplea el método descrito por la norma ASTM 1104-56.

1.4. Pretratamiento de la biomasa

La biomasa lignocelulósica al ser de naturaleza recalcitrante y compleja producto de las interacciones entre los componentes de su estructura como lignina, celulosa y hemicelulosa, necesita ser sometida a un pretratamiento para lograr aumentar su accesibilidad, permitiendo la despolimerización eficaz de los polisacáridos (Espinosa Negrín et al., 2021; Salvachúa Rodríguez, 2013). La aplicación de un pretratamiento tiene ciertos objetivos como: mejorar la solubilidad y degradación de los componentes de la biomasa, aumentar el área de superficie disponible (Hosseini Koupaie et al., 2019) y disminuir la cristalinidad de la celulosa. Los métodos de pretratamiento pueden ser físicos, químicos y biológicos.

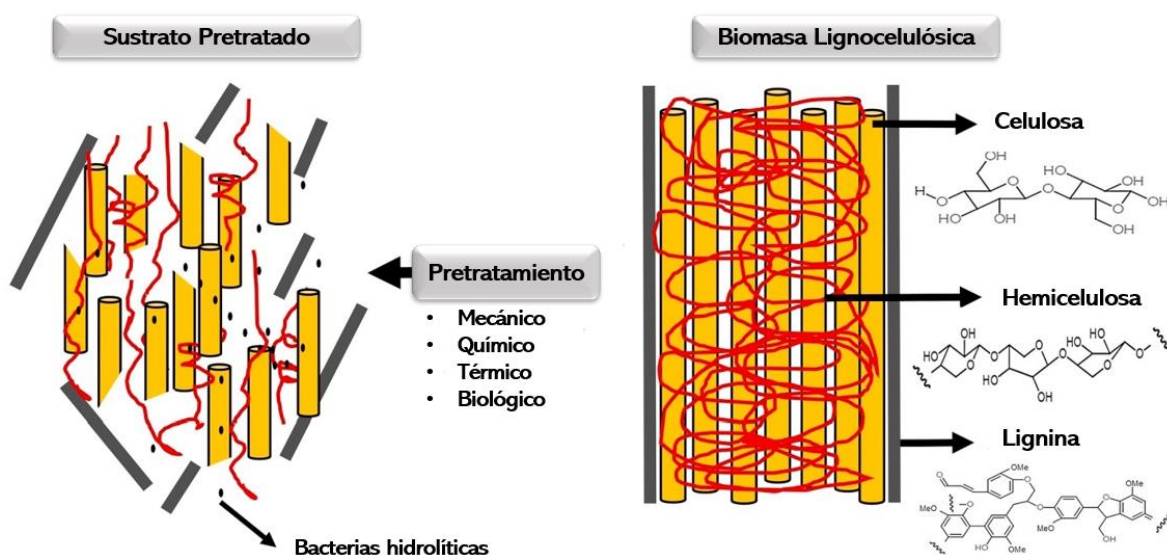


Figura 11. Pretratamiento de biomasa lignocelulósica. Tomado de (Hosseini Koupaie et al., 2019).

1.4.1. Pretratamiento físico

El pretratamiento físico o mecánico emplea la fuerza física para transformar la biomasa lignocelulósica a un tamaño de partículas reducido mediante procesos de triturado y molienda (Hosseini Koupaie et al., 2019; Salvachúa Rodríguez, 2013). Anterior a la operación de

reducción de tamaño, se realiza un pretratamiento de secado con la finalidad de evitar que se forme una pasta al momento de moler. Estos dos tratamientos conducen al incremento de tamaño de poro y área superficial de la materia prima además de disminuir la cristalinidad y grado de polimerización de la celulosa (Bayona Albalate, 2021; Espinosa Negrín et al., 2021).

1.4.2. Pretratamiento químico

El pretratamiento químico puede consistir en el uso de sustancias ácidas, las cuales provocan la rotura de enlaces glucosídicos entre celulosa y hemicelulosa y causa la descomposición de las cadenas poliméricas en unidades monómeras de azúcar, contrariamente, también se pueden emplear álcalis que tienen como finalidad la desestructuración o solubilización de la lignina. Estos pretratamientos presentan ciertos inconvenientes como el alto costo operativo para el pretratamiento ácido ya que pueden ser tóxicos y corrosivos mientras que para el pretratamiento alcalino podría presentar problemas para la recuperación al finalizar esta reacción (Roy et al., 2020).

1.5. Hidrólisis

La hidrólisis se puede definir como una reacción química mediante la cual se da la descomposición de compuestos orgánicos de estructura compleja en otros más simples a través de la acción del agua (Abril González, 2016), facilitando la accesibilidad de ciertos microorganismos en posteriores etapas de fermentación para la obtención de bioetanol. Cuando la celulosa es sometida a hidrólisis completa da paso a la obtención exclusiva del monómero D-glucosa, mientras que, partiendo de hemicelulosas se obtiene un conjunto de pentosas y hexosas (Rodríguez Valiente, 2016).

1.5.1. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida es un tratamiento químico que se realiza con sustancias ácidas para transformar cadenas polisacáridas que se encuentran en residuos lignocelulósicos en sus monómeros principales (Rodríguez Valiente, 2016). Este proceso hace uso de soluciones concentradas o diluidas a temperaturas bajas y elevadas respectivamente, se han reportado estudios en los que se han utilizado ácidos como sulfúrico, clorhídrico, nítrico, fosfórico, ácidos orgánicos, entre otros (Liao et al., 2020). El ácido sulfúrico por su efectividad y

conveniencia ha demostrado ser el más utilizado para romper el material lignocelulósico que constituye la biomasa (Li et al., 2010).

Este tipo de hidrólisis ha sido bastante estudiado por su alta velocidad y simplicidad, especialmente la que utiliza ácidos diluidos lo que hace que sea ampliamente utilizado a nivel industrial (Solarte-Toro et al., 2019). Este tratamiento ha sido muy utilizado en la obtención de azúcares reductores que luego son convertidos a bioetanol a partir de diversas biomásas como el bagazo de caña o residuos de cascarilla de arroz (Domínguez et al., 2011; Loja Sánchez, 2016).

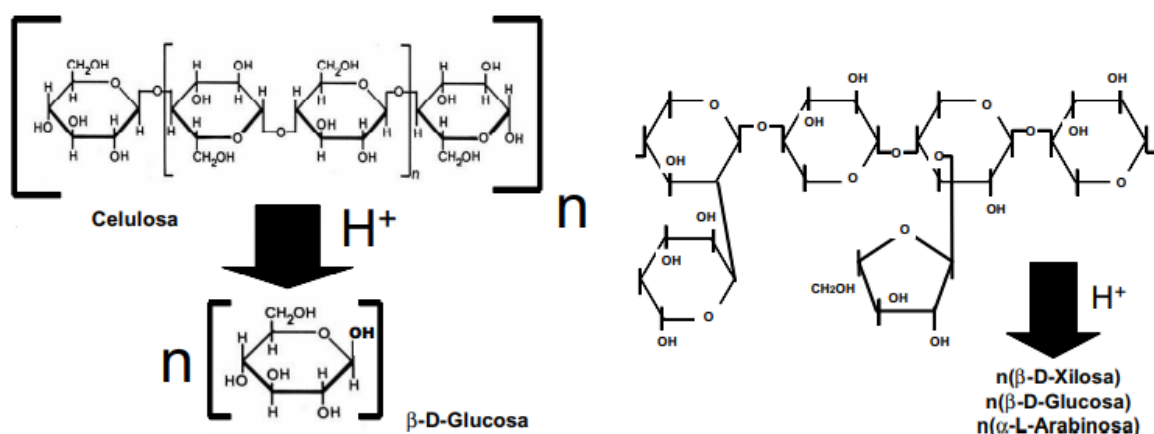


Figura 12. Hidrólisis de materiales lignocelulósicos. Tomado de (Aguilar Rivera, 2010).

1.5.1.1. Hidrólisis ácida diluida

El método de hidrólisis que emplea ácidos diluidos puede operar a concentraciones entre 0,1 y 10% v/v, temperaturas altas (100 - 250 ° C) y con tiempos de reacciones bajos (Roy et al., 2020). La principal ventaja que presenta este tipo de hidrólisis es su bajo consumo de ácidos, sin embargo, para conseguir rendimientos considerados aceptables para obtención de glucosa (mayor al 90%), es necesario utilizar temperaturas elevadas y tiempos de residencia relativamente menores, bajo dichas condiciones se ha reportado que los mejores rendimientos obtenidos se encontraron cerca del 60% del rendimiento teórico (Oliva Domínguez, 2003).

1.5.1.2. Hidrólisis ácida con ácido concentrado

El uso de ácidos concentrados en el proceso de hidrólisis involucra la utilización de condiciones a altas concentraciones que van del 30 al 70% v/v, bajas temperaturas (menor a

100 ° C) y tiempos de reacción largos. Con el parámetro de baja temperatura se permite la disolución de celulosa lo cual se considera energéticamente más conveniente, sin embargo, se producen grandes cantidades de residuos de neutralización que presentan dificultades para su recuperación además de ser muy corrosivos. Adicionalmente, es posible que se dé la degradación no deseada de azúcares a furanos como furfural y 5-hidroximetilfurfural (HMF), sustancias húmicas insolubles, ácidos carboxílicos (Liao et al., 2020), ácidos fenólicos y aldehídos (Roy et al., 2020).

1.5.2. Hidrólisis alcalina

La hidrólisis alcalina sirve para escindir los enlaces éster entre cadenas de hemicelulosa y lignina, lo que conduce a la solubilización de la lignina (Roy et al., 2020). Mediante reacciones de solvatación y saponificación este tratamiento provoca un hinchamiento de la matriz lignocelulósica aumentando la porosidad y disminuyendo la cristalización y grado de polimerización de la celulosa lo que facilita la accesibilidad a la misma (Rodríguez Valiente, 2016; Gongora Cauich, 2016). Entre los álcalis comúnmente utilizados están el hidróxido de sodio, calcio y potasio además de amoníaco que pueden emplearse conjuntamente con agentes oxidativos como O₂ y H₂O₂ para mejorar la deslignificación (Liao et al., 2020).

La principal desventaja de la hidrólisis alcalina es la conversión en sales irrecuperables o la agregación de las mismas en el material lignocelulósico lo que provoca inconvenientes en tratamientos posteriores (Loow et al., 2016).

1.5.3. Hidrólisis enzimática

El tratamiento de hidrólisis enzimática se realiza mediante el uso de enzimas aisladas de organismos que los producen, las familias de enzimas comúnmente utilizadas son lacasas y peroxidases (Roy et al., 2020), que son altamente específicas en la conversión de la biomasa lignocelulósica en monosacáridos. Los productos de este tipo de hidrólisis son en mayoría pentosas y hexosas en las que se incluye la glucosa, compuestos de interés que pueden ser fermentados para la producción de etanol (Gongora Cauich, 2016). El efecto de las enzimas sobre la biomasa va a depender del tipo de enzimas así como también de la composición de la biomasa a ser tratada (Hosseini Koupaie et al., 2019).

Este método presenta una ventaja importante de que no necesita la agregación de agentes químicos por lo que el grado de severidad disminuye, favoreciendo a la no formación de compuestos inhibidores, corrosivos o tóxicos en el producto hidrolizado (Bayona Albalate, 2021). Sin embargo, entre sus desventajas están el bajo rendimiento de reacción, el alto costo de las enzimas y tiempos prolongados en la reacción de hidrólisis (Li et al., 2008; Saini et al., 2015).

1.6. Variables del proceso de hidrólisis ácida en cacao

1.6.1. Temperatura

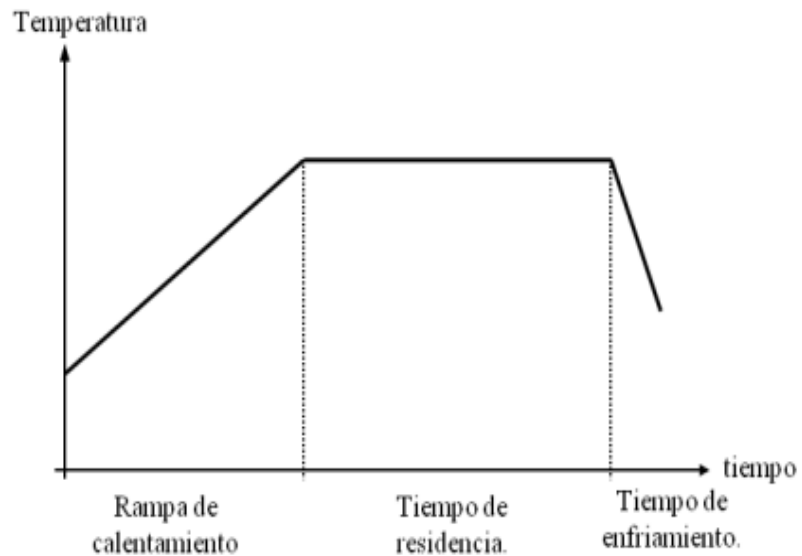
La temperatura es un factor que influye grandemente en la reacción de hidrólisis, es por esto que al utilizar ácidos concentrados la temperatura de trabajo debe ser baja mientras que al utilizar ácidos diluidos la temperatura establecida debe ser elevada (Loja Sánchez, 2016).

1.6.2. Tiempo de reacción

El tiempo en la reacción se puede dividir en tres etapas:

- Rampa de calentamiento: es aquel tiempo que tarda en alcanzar la temperatura máxima deseada y es la etapa en la que se da la mayor parte de extracción de monosacáridos de la hemicelulosa.
- Tiempo de residencia: en este tiempo el material lignocelulósico se mantiene a la temperatura máxima, se da una extracción de gran parte de azúcares de azúcares debido a la acidez y altas temperaturas en este punto.
- Tiempo de enfriamiento: al ser una etapa que pasa con rapidez, no tiene efecto en la reacción (Barroso Casillas, 2010).

Gráfica 1. Gráfica temperatura vs tiempo para un proceso hidrotérmico.



Nota. La gráfica presenta las partes del tiempo de reacción, en una gráfica temperatura vs tiempo de cocción en proceso hidrotérmico. Tomado de (Barroso Casillas, 2010).

1.6.3. Concentración de ácido

En el proceso de hidrólisis ácida la concentración del ácido a emplear es una variable que tiene influencia en la reacción, se puede trabajar con ácidos concentrados o diluidos tomando en cuenta que se busca la máxima extracción de azúcares (Abril González, 2016).

En la Tabla 4, se presentan diferentes condiciones de operación empleadas en el proceso de hidrólisis ácida relacionada con desechos de cacao.

Tabla 4. Condiciones de operación en la reacción de hidrólisis ácida en biomasa de cacao.

| Biomasa | Concentración del ácido H ₂ SO ₄ (% v/v) | Temperatura (° C) | Tiempo (min) | Concentración glucosa (g/L) | Referencia |
|-----------------------------|--|-------------------|--------------|-----------------------------|--|
| Cascarilla de cacao | 3,3 | 80 | 150 | 45,08 | (Oyetuji, 2015) |
| Cáscara de mazorca de cacao | 2,9 | 130 | 30 | 3,75 | (Ribeiro Vasconcelos de Sá et al., 2015) |
| Cáscara de mazorca de cacao | 3,4 | 120 | 21,6 | 4,55 | (Batista Santana et al., 2018) |
| Cáscara de mazorca de cacao | 5,36 | 90 | 120 | 1,7 | (Samah et al., 2011) |

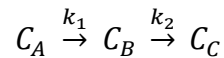
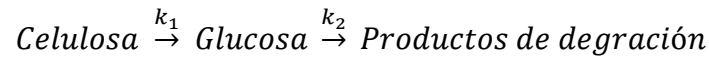
Nota: Esta tabla presenta algunos parámetros como temperatura, tiempo y concentración de glucosa obtenida de la reacción de hidrólisis ácida a partir de biomasa de cacao con el uso de diferentes concentraciones de ácido sulfúrico.

1.7. Cinética química de la reacción de hidrólisis

La reacción de hidrólisis ácida de materiales celulósicos tiene un alto grado de complejidad, debido a que ocurren varias reacciones químicas en serie y paralelo además de que se presentan dos fases en dichas reacciones, por lo tanto todo el mecanismo de reacción no se ha determinado completamente por las dificultades prácticas en la medición de la velocidad de reacción en cada reacción individual (Carrasco & Roy, 1992).

De acuerdo a esto, se puede realizar una aproximación para un mejor entendimiento y predicción del comportamiento de la reacción de hidrólisis ácida en la fracción cristalina de la celulosa para esto se considera como reacción pseudo-homogénea de primer orden y constantes de velocidad aparentes. En estudios anteriores este modelo se ha utilizado para determinar la cantidad de glucosa a partir de la celulosa de residuos de la corteza de cacao, tomando en cuenta que la glucosa es considerada el azúcar de mayor interés en el producto hidrolizado (Sigüencia Ávila et al., 2020).

Ecuación 1. Hidrólisis de la celulosa.



Nota. Tomado de (Sigüencia Ávila et al., 2020).

De acuerdo a la ecuación 1, se considera que la glucosa es el producto de interés en la reacción de hidrólisis, por lo que se considerará solamente la primera parte de la reacción de conversión de celulosa a glucosa con una constante de velocidad k_1 .

1.8. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

El método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es muy utilizado para la identificación y cuantificación de diversos monosacáridos, debido a que es una técnica versátil y tiene un amplio campo de aplicación (Batista Santana et al., 2018; Samah et al., 2011).

Este método de separación se basa en las diversas interacciones, ya sean físicas o químicas que pueden darse entre la muestra y una fase estacionaria que se encuentra contenida en una columna cromatográfica. Estas interacciones hacen que los diferentes compuestos de la muestra pasen a través de la columna a distintas velocidades y así se produce su separación (Torres et al., 2020).

La identificación y cuantificación de monosacáridos presentes en diferentes muestras de hidrolizado se realiza mediante la comparación de tiempos de retención y áreas de picos de dichas muestras así como también tiempos de retención y picos de las soluciones patrón (Abril González, 2016).

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Muestreo de la biomasa

Las mazorcas de cacao fueron recolectadas en una finca cacaotera en la parroquia Putucay, ubicada en el límite entre las provincias de Azuay y Cañar, al ser una de las zonas con alta producción de cacao y fácil accesibilidad. Se realizó un muestreo simple aleatorio de las mazorcas de cacao de la variedad CCN-51, identificando su estado de madurez óptimo para la cosecha. Se recolectó un aproximado de 3 Kg de materia prima.

2.2. Pretratamiento de la materia prima

El objetivo del pretratamiento de la muestra es reducir su tamaño además de la eliminación de humedad para obtener una muestra homogénea. Para lo cual se lava las mazorcas de cacao con agua fría (20 °C), y se realizan cortes de la cáscara en cubos pequeños de 2 cm de lado. Posteriormente se secó en una estufa marca BIOBASE a 105 °C por 24 horas, y se realizó una molienda y filtrado de la biomasa por tamices malla N° 35 y 60.

2.3. Análisis químico de la biomasa

La composición química de la biomasa lignocelulósica (lignina, celulosa y hemicelulosa) se determina por el método tradicional de la extracción química, separando así cada fracción de la que está compuesta la biomasa (Álvarez Rodríguez, 2013). La caracterización química se realizó en el laboratorio en el Laboratorio de Ingeniería de las Reacciones Químicas, Catálisis y Tecnologías del Medio Ambiente, ubicado en el campus Balzay de la Universidad de Cuenca.

2.3.1. Eliminación de extraíbles

Existen determinados compuestos que pueden interferir en las siguientes etapas de caracterización química, por lo que es importante que la muestra esté libre de extractos. Estos componentes se eliminan en dos fases de extracción siguiendo el procedimiento basado en la norma NREL/TP; 510-42619 “Determination of extractives in biomass”. Este método

describe una técnica para determinar la cantidad de material no volátil soluble en solventes, utilizando para el presente estudio agua y etanol.

Según la norma se pesa 12 g de muestra seca, y se coloca dentro de un cartucho elaborado a partir de papel filtro, luego se introduce el mismo dentro del equipo Soxhlet (Eisco). Medir 300 ml de agua destilada y verter en el matraz de extracción de fondo plano. Conectar el matraz al aparato de extracción y ajustar la temperatura para mantener el líquido en ebullición durante 4 horas. Transcurrido el tiempo se repite el proceso, pero en este caso, utilizando 300 ml de etanol al 99% como solvente. Una vez culminada la extracción se retira el cartucho, se lava con agua destilada para eliminar restos de solvente, se coloca en una cápsula de porcelana seca y se lleva a la estufa (BIOBASE) a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta conseguir peso constante. Este ensayo se realizó por duplicado.

Para el cálculo del contenido de extractos solubles se emplea la ecuación 2.

Ecuación 2. Porcentaje de extractivos.

$$\%Extractivos = \frac{PM_o - PM_f}{PM_o} * 100$$

Donde:

PM_f : Peso de la muestra seca sin extractos, g

PM_o : Peso de la muestra original seca, g

2.3.2. Determinación de lignina insoluble en ácido

El método utilizado se basa en la norma TAPPI T-222 om-02, en el cual los carbohidratos de la muestra se hidrolizan y se solubilizan, permitiendo la determinación de lignina mediante métodos gravimétricos.

Se pesa 1 g de muestra libre de extraíbles y se coloca la muestra en un vaso de precipitación. Luego, se añade gradualmente 15 ml de H_2SO_4 al 72% manteniendo el vaso en un baño frío de $2 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante la dispersión. Posteriormente, se cubre el vaso con una luna de reloj y se mantiene en un baño María a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ revolviendo la muestra frecuentemente por 2 horas. Transcurrido este tiempo, se traspasa el material a un vaso de 600 ml, se diluye y enjuaga

con agua destilada hasta completar un volumen final de 370 ml con la finalidad de obtener una concentración de H_2SO_4 al 3%. Después, se hierve la solución por 4 horas manteniendo el volumen constante mediante la adición frecuente de agua caliente. A continuación, se deja que la lignina se asiente en una posición inclinada para luego sin agitar el precipitado proceder a filtrar y lavar con agua destilada caliente el residuo sólido. Finalmente se traslada el filtro con lignina a una cápsula de porcelana previamente secada y se deja en una estufa (BIOBASE) a $105\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$ hasta obtener peso constante. Este procedimiento se efectúa por duplicado.

Para el cálculo del contenido de lignina se emplea la ecuación 3:

Ecuación 3. Porcentaje de lignina.

$$\%Lignina = \frac{PM_f}{PM_o} * 100$$

Donde:

PM_f : Peso de la muestra seca, g

PM_o : Peso de la muestra original sin extraíbles, g

2.3.3. Determinación de holocelulosa

Para la determinación de holocelulosa se sigue el procedimiento basado en la norma ASTM 1104-56 donde la lignina se oxida y se transforma en un producto soluble en agua, por la acción del ácido cloroso que se forma a partir de la reacción del clorito de sodio y ácido acético (Cabrera Salazar & Chamba Ramírez, 2022).

Se pesa 2,5 g de muestra seca libre de extraíbles, en un Erlenmeyer de 250 ml y se añade 160 ml de agua destilada, 1 g de clorito de sodio y 0,2 ml de ácido acético glacial, mientras se somete el Erlenmeyer a un baño de agua entre (70 - 80) °C. Se cubre y se mantiene en agitación constante por una hora. Se repite el proceso 3 veces más y se espera 1 hora tras la última adición, para posteriormente enfriar la muestra hasta una temperatura de 10 °C, en un baño de agua con hielo. Luego se filtra y se lava la muestra con 100 ml de agua destilada. Finalmente se coloca el filtro en una cápsula de porcelana seca y se lleva a la estufa

(BIOBASE) a 105 °C hasta obtener peso constante. Este procedimiento se realizó por duplicado. Se almacenan las muestras para la determinación de α -celulosa.

Para el cálculo del contenido de holocelulosa se emplea la ecuación 4.

Ecuación 4. Porcentaje de holocelulosa.

$$\%Holocelulosa = \frac{PM_f}{PM_o} * 100$$

Donde:

PM_f : Peso de la muestra seca después del tratamiento, g

PM_o : Peso de la muestra original antes del tratamiento, g

2.3.4. Determinación de α -celulosa

El método utilizado para determinación de α -celulosa se basa en la norma TAPPI T-203 m-58, la cual hace uso de una solución de hidróxido de sodio al 17,5% debido a que la celulosa es insoluble en estas condiciones y por tanto se puede determinar al quedar como residuo sólido.

Se pesa 1 gramo de muestra de holocelulosa en un vaso de precipitación, luego se sumerge el mismo en un baño de agua a 25 °C para luego añadir 10 ml de una solución de NaOH al 17,5%, se agita y se deja reposar por 5 minutos. A continuación, se agregan 5 ml más de NaOH al 17,5%, nuevamente se agita y se deja en reposo por otros 30 minutos. Pasado este tiempo, se añaden 30 ml de agua destilada, se agita y se pone en reposo por 1 hora más. Posteriormente, se filtra por un embudo con papel filtro y se lava el residuo sólido con una mezcla compuesta por 30 ml de agua y 25 ml de NaOH al 17,5%. Después, se realizan lavados con 30 ml de agua destilada y se vierten 5 ml de ácido acético al 10% en pequeñas cantidades. Finalmente se hace otro lavado con 50 ml de agua destilada. Por último, se coloca el filtro con celulosa en una cápsula de porcelana preparada y se deja a 105 °C en la estufa (BIOBASE) hasta obtener peso constante. Este procedimiento se realiza por duplicado.

El cálculo del contenido de α -celulosa se realiza mediante la ecuación 5:

Ecuación 5. Porcentaje de α -celulosa.

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{PM_f}{PM_o} * 100$$

Donde:

PM_f : Peso de la muestra seca después del tratamiento, g

PM_o : Peso de la muestra original antes del tratamiento, g

2.3.5. Determinación de hemicelulosa

La cantidad de hemicelulosa puede ser determinada mediante la diferencia entre holocelulosa y celulosa, como lo muestra la ecuación 6:

Ecuación 6. Porcentaje de hemicelulosa.

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \% \text{ Holocelulosa} - \% \text{ Celulosa}$$

2.4. Reacción de hidrólisis ácida

Para el proceso de hidrólisis ácida se establecieron los factores o variables a manipular y que afectan al proceso, mediante una revisión bibliográfica. Se obtuvieron datos, que se pueden revisar en la tabla 4, que sirven como base en cuanto a las condiciones más favorables para el desarrollo de la reacción de hidrólisis ácida; tomando en consideración esto, se experimenta con las siguientes condiciones de operación:

- Tiempo: 0 min, 15 min, 30 min, 50 min y 70 min.
- Temperatura: 100 °C
- Concentración de H₂SO₄: 4% en volumen

Para iniciar con la experimentación de hidrólisis ácida de la cáscara de cacao, previamente se prepara una solución de H₂SO₄ al 4 %. Luego se pesa 5 g de muestra seca y se mide 100 ml de ácido sulfúrico al 4 % en una probeta. Se coloca la muestra y el ácido diluido dentro del reactor batch (HT LAB), se asegura la tapa ajustando los tornillos de seguridad, y se programa la temperatura establecida. Una vez que el reactor alcance la temperatura requerida se procede a tomar el tiempo, puesto que la reacción para determinado experimento inicia

desde ese instante. Transcurridos los tiempos de reacción establecidos, se apaga el reactor y se realiza un proceso de enfriamiento y despresurización, es importante mencionar que este lapso de tiempo es similar entre experimentaciones. Luego se retira el recipiente con la muestra hidrolizada e inmediatamente se filtra. El líquido recolectado se estabiliza el pH entre 4-9 con una solución de NaOH al 30 % y se pasa a través de un filtro de membrana de 0,45 μm para su posterior lectura en el HPLC. Paralelamente, el residuo sólido se termina de filtrar y se lava con agua destilada, y se coloca el filtro en una cápsula de porcelana preparada y se deja a 105 °C en la estufa (BIOBASE) hasta obtener peso constante. Debido a que el reactor empleado no permite tomar muestras a diferentes tiempos durante una sola experimentación, se procedió a efectuar un ensayo de hidrólisis por cada tiempo analizado. Este procedimiento se llevó a cabo por duplicado para los tiempos de 30 y 70 minutos para mayor veracidad.

2.5. Análisis de productos líquidos por HPLC

El análisis de productos líquidos resultantes de la reacción de hidrólisis ácida se realizó mediante HPLC, dichas determinaciones fueron realizadas por parte de la Técnica encargada en el Laboratorio de Ingeniería de Reactores, Catálisis y Tecnologías del Medio Ambiente, donde el equipo y condiciones de operación para el análisis de muestras se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Equipo y condiciones de operación de HPLC.

| Parámetro | Descripción |
|-----------------|---|
| Equipo | Cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca JASCO |
| Columna | Nucleogel sugar 810 Ca |
| Fase móvil | Agua: H ₂ SO ₄ 0,1% v/v |
| Temperatura | 85 °C |
| Modo de elución | Isocrático |

Nota: Autoría propia.

2.6. Determinación de la cinética de reacción

Para el análisis de la cinética química de la reacción de hidrólisis se aplica el método de integración por regresión lineal, para lo cual se experimenta el orden de reacción ($n= 0, 1$ y 2) mediante la suposición de los mismos buscando el mejor ajuste. Para esto, se considera la formación de glucosa (A) como producto utilizando las Ecuaciones 7 y 8.

Ecuación 7. Ecuación de ley de velocidad de integrada.

$$r_A = \frac{dC_A}{dt}$$

Nota: La ecuación de velocidad de reacción muestra la relación entre la concentración del reactivo o producto respecto al tiempo. Tomado de (Ebbing & Gammon, 2010).

Ecuación 8. Ecuación de ley de velocidad de reacción.

$$r_A = k C_A^n$$

Nota: La ecuación representa la relación entre la velocidad de una reacción con la concentración del reactivo o producto elevada a una potencia. Tomado de (Ebbing & Gammon, 2010).

Mediante integración y suponiendo el orden de reacción se obtienen las ecuaciones 9, 10 y 11.

Ecuación 9. Ecuación de concentración de glucosa, $n=0$.

$$C_A = C_{A0} + kt$$

Ecuación 10. Ecuación de concentración de glucosa, $n=1$.

$$\ln C_A = \ln C_{A0} + kt$$

Ecuación 11. Ecuación de concentración de glucosa, $n=2$.

$$\frac{1}{C_A} = \frac{1}{C_{A0}} - kt$$

2.7. Análisis de residuos sólidos

Como resultado de la reacción de hidrólisis ácida, también se obtienen residuos sólidos a los cuales se les realiza un lavado con agua destilada para eliminar restos de ácido, luego se secan en la estufa (BIOBASE) por un tiempo de 24 horas. Transcurrido este tiempo, se hace una nueva caracterización química con el objetivo de conocer su composición final en lignina y holocelulosa, siguiendo los mismos procedimientos basados en las normas TAPPI T-222 om-02 y ASTM 1104-56 respectivamente.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de la materia prima

Los resultados obtenidos respecto a la caracterización química de los residuos de cacao se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Composición química estructural de la cáscara de cacao.

| Componente | % Peso |
|--------------------------|--------------|
| Extraíbles (agua-etanol) | 21,57 ± 0,13 |
| Lignina | 27,59 ± 0,62 |
| Holocelulosa | 35,52 ± 0,20 |
| α -Celulosa | 21,65 ± 0,13 |
| Hemicelulosa | 13,58 ± 2,71 |

Nota: Autoría propia.

Como se puede observar en los resultados de la tabla 6, el contenido de extraíbles de la cáscara de cacao alcanza un valor de $21,57 \pm 0,13$ % lo que indica que después del tratamiento aplicado se pudo eliminar dichos compuestos como, material inorgánico, azúcares no estructurales y material nitrogenado, entre otros, permitiendo una mayor precisión en análisis posteriores. Investigadores como (Titiloye et al., 2013) mediante la introducción de otros solventes con acetona obtuvo un porcentaje de extraíbles mayor de $23,66 \pm 1,77$ % el cual puede atribuirse al tipo de solvente utilizado.

Se analiza que el mayor contenido estructural de la biomasa es la lignina con un $27,59 \pm 0,62$ %; seguido de un $21,65 \pm 0,13$ % de α -Celulosa, y por debajo se encuentra el contenido de hemicelulosa con un $13,58 \pm 2,71$ %. Otros autores como (Sánchez Quezada et al., 2018) presenta la siguiente composición química: lignina 25,7%, celulosa 53,7% y hemicelulosa 18,7% para cáscara de cacao variedad CCN-51, al realizar la comparación con los resultados obtenidos en esta investigación, es posible observar que existen variaciones que se podrían atribuir a ciertos factores como estado de madurez del fruto, transporte, almacenamiento,

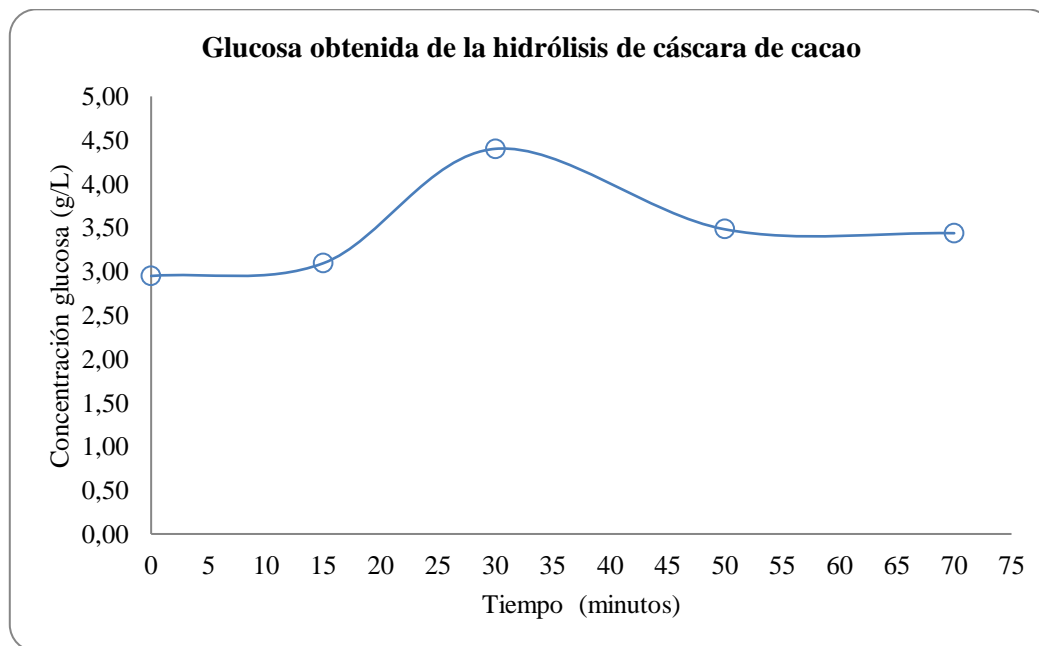
condiciones del cultivo y postcosecha, pretratamiento de la biomasa, entre otros (Herrera-Rengifo et al., 2020).

De acuerdo a esto, el contenido de lignina aporta significativamente a las propiedades mecánicas de la estructura de la planta debido a que proporciona soporte y rigidez a la misma; de tal manera que la cáscara de cacao se puede considerar una excelente fuente de lignina para su uso potencial en productos como asfalto en emulsión, cemento, adhesivos para tableros aglomerados y otros materiales de construcción (Díaz-Oviedo et al., 2022). En conjunto los contenidos de α -Celulosa y hemicelulosa que posee esta biomasa, representan una fuente importante para la obtención de glucosa, la misma que podría ser aprovechada en la producción de biocombustibles.

3.2. Hidrólisis ácida

En la gráfica 2, se presentan los resultados de las concentraciones de glucosa obtenidas respecto al tiempo luego de la reacción de hidrólisis ácida.

Gráfica 2. Concentración de glucosa obtenida luego la reacción hidrólisis de cáscara de cacao.



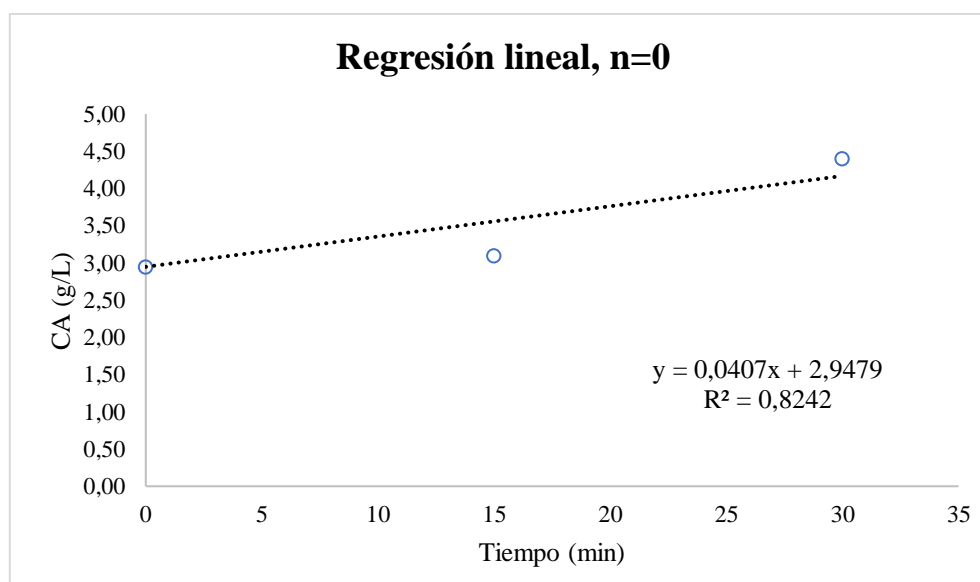
Nota. La gráfica presenta las concentraciones de glucosa obtenidas luego del proceso de hidrólisis ácida de la mazorca de cacao con condiciones: 4% de H_2SO_4 y $100\text{ }^\circ C$. Fuente: Autoría propia.

En la gráfica se puede observar que la región cinética de la formación de glucosa se encuentra en el intervalo de tiempo de 0 a 30 minutos, según la cual la concentración de glucosa va en aumento, alcanzado un máximo de 4,40 g/L, concentración cercana a la obtenida por (Batista Santana et al., 2018) de 4,55 g/L en condiciones: 3,4 % v/v H₂SO₄, 120 °C y 21,6 minutos. Otras investigaciones han dado resultados de 3,75 g/L en condiciones: 2,9 % v/v H₂SO₄, 130 °C y 30 minutos según lo indica (Ribeiro Vasconcelos de Sá et al., 2015). Es importante mencionar que el tiempo de reacción se toma desde que el reactor alcanza las condiciones deseadas por lo que para el tiempo 0, se obtiene una concentración inicial de glucosa de 2,95 g/L. Respecto a los tiempos de 50 y 70 minutos se verifica que la formación de glucosa disminuye lo que indica su descomposición en subproductos de degradación como furfural e hidroximetilfurfural (HMF).

3.3. Cinética química

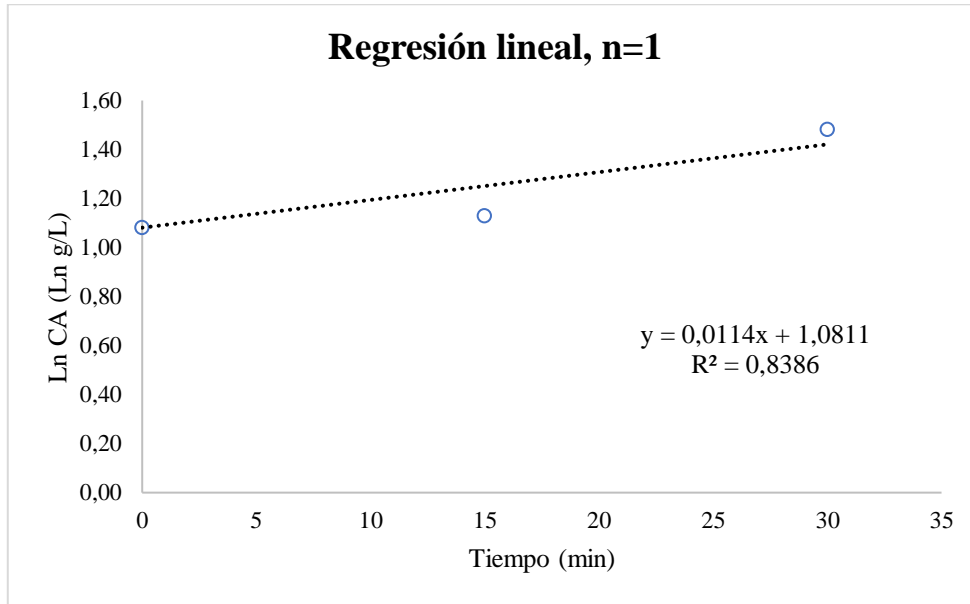
El análisis de la cinética de la reacción de hidrólisis ácida de la cáscara de cacao se realizó en la región cinética en un rango de tiempo de 0 a 30 minutos. Mediante el método de integración por regresión lineal se estableció el mejor ajuste suponiendo órdenes de reacción 0, 1 y 2. Los resultados se muestran en las gráficas 3, 4 y 5.

Gráfica 3. Regresión lineal, n=0.



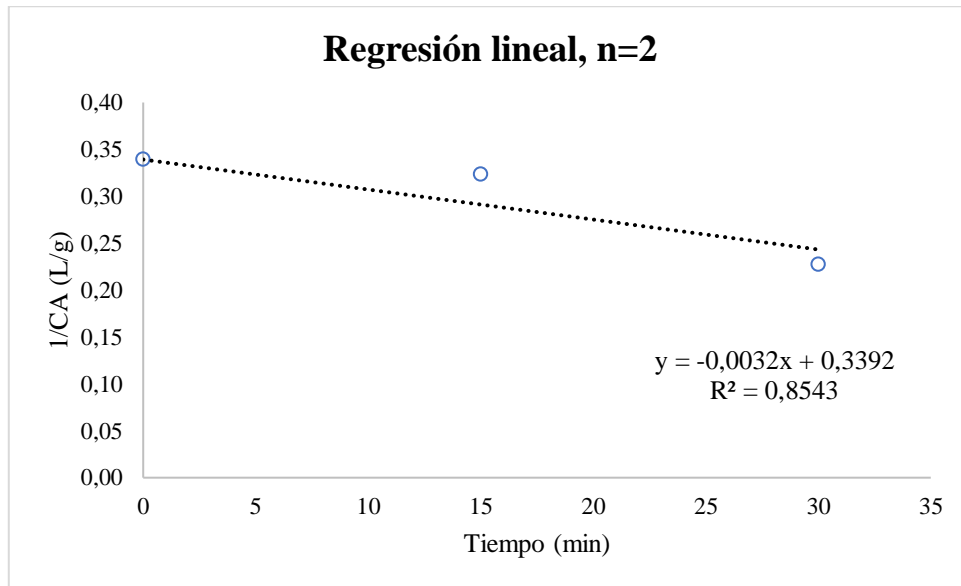
Nota: Autoría propia.

Gráfica 4. Regresión lineal, n=1.



Nota: Autoría propia.

Gráfica 5. Regresión lineal, n=2.



Nota: Autoría propia.

De acuerdo a las gráficas obtenidas, el orden que mejor se ajusta a la regresión lineal es el orden $n = 2$ con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,8543$, por lo que la ecuación de esta gráfica se muestra en la ecuación 12.

Ecuación 12. Ecuación de la recta para n=2.

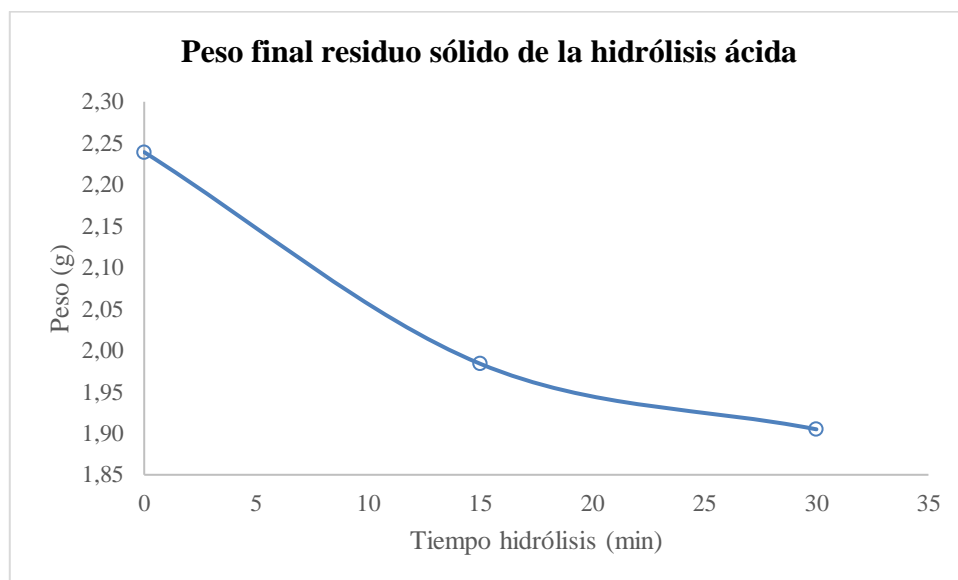
$$y = -0,0032 x + 0,3392$$

Respecto a la ecuación 12, la pendiente de la recta se encuentra directamente relacionada con la constante de velocidad (k) de la Ecuación 11, por lo tanto, se obtiene un $k = 0,0032 \text{ L g}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

3.4. Caracterización del residuo sólido de la reacción de hidrólisis

Los resultados de los pesos del residuo sólido se presentan en la gráfica 6.

Gráfica 6. Gráfica de pesos de residuo sólido de la hidrólisis ácida.



Nota: La gráfica presenta la variación del peso del residuo sólido de la reacción de hidrólisis ácida respecto al tiempo. Fuente: Autoría propia.

En la gráfica se puede evidenciar que el cambio de peso del material sólido se produce en un intervalo de tiempo de 0 a 30 minutos, por consiguiente, la caracterización química se procedió a realizar para este rango además de que en este mismo periodo de tiempo se pudo verificar anteriormente la existencia de la región cinética de la reacción de hidrólisis ácida.

En la tabla 7, se indican los resultados de la caracterización química general de los residuos sólidos, resultantes de los tiempos de reacción de 0 a 30 minutos.

Tabla 7. Composición química de los residuos sólidos de la hidrólisis ácida.

| Tiempo experimentación (minutos) | % Lignina | % Holocelulosa |
|---|------------------|-----------------------|
| 0 | 44,95 | 53,41 |
| 15 | 47,42 | 52,21 |
| 30 | 49,54 | 49,96 |

Nota: Autoría propia.

Se observa que el contenido de lignina aumenta con el tiempo de reacción, llegando a un 49,54% para un tiempo de 30 minutos, mientras que el contenido de holocelulosa disminuye alcanzando un 49,96%. Estos resultados se pueden atribuir al ataque ácido que se da en la reacción de hidrólisis debido a que los enlaces éter (C-O) y alquílicos (C-C) presentes en la lignina hacen que la misma sea resistente a la degradación (Chávez-Sifontes & Domine, 2013). Es decir, se hidroliza la celulosa y hemicelulosa dando como resultado el aumento de lignina en la muestra. El análisis de los residuos sólidos de la hidrólisis permite evaluar la magnitud de los cambios estructurales que provoca la hidrólisis ácida en la biomasa además de sus posibles aplicaciones.

Las muestras sólidas que se obtienen como residuo de la hidrólisis ácida presentan porcentajes altos de lignina por lo tanto la misma puede ser sometida a diferentes transformaciones con el objetivo de producir compuestos de interés que pueden ser usados en dispersantes de pesticidas, emulsificantes y secuestradores de metales pesados, también puede ser incorporada en resinas o adhesivos mejorando las propiedades de desempeño (Chávez-Sifontes & Domine, 2013). Mientras que la holocelulosa al estar conformada por celulosa y hemicelulosa sigue siendo un compuesto importante para la obtención de biodiésel y bioetanol de primera, segunda y tercera generación.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

En este proyecto de investigación se obtuvo $21,57 \pm 0,13$ de extraíbles utilizando agua-etanol como solventes, también se pudo verificar que los componentes predominantes de la estructura de la cáscara de cacao son lignina con $27,59 \pm 0,62$ %, α -Celulosa $21,65 \pm 0,13$ % y hemicelulosa $13,58 \pm 2,71$, siendo esta biomasa una buena fuente de lignina para uso industrial en asfalto, adhesivos y otros materiales de construcción. Por último, los porcentajes de celulosa y hemicelulosa obtenidos indican que este residuo puede ser una fuente potencial de polisacáridos para la elaboración de biocombustibles.

En la hidrólisis ácida, las condiciones de mayor obtención de glucosa fueron 100 °C, durante 30 minutos y 4% v/v H_2SO_4 , por lo que a partir del tiempo óptimo se da paso a la degradación de azúcares en otras sustancias como furanos y ácidos carboxílicos. Se alcanzó un máximo de concentración de glucosa de 4,40 g/L medido mediante cromatografía líquida (HPLC).

En cuanto al estudio de la reacción de hidrólisis, a través del método de integración por regresión lineal se logró determinar que la cinética correspondiente es de segundo orden ($n = 2$) con un mayor coeficiente de determinación ($R^2 = 0,8543$) y a la vez se obtuvo una constante de velocidad de $k = 0,0032$ L g^{-1} min^{-1} que indica la proporcionalidad en la relación entre la velocidad y la concentración de formación de glucosa, siendo este valor único para la temperatura trabajada.

Finalmente, respecto a la caracterización del residuo sólido de la hidrólisis se verifica que el mismo sigue estando constituido por lignina y un porcentaje considerable de holocelulosa. Además se pudo observar que existió una reducción de peso de este sólido comprobando así que el mismo se está convirtiendo en azúcares solubles conforme avanza la reacción de hidrólisis en la región cinética.

4.2. Recomendaciones

- Se recomienda efectuar dos o más experimentaciones con diferentes tiempos de reacción manteniendo las mismas condiciones en cuanto a temperatura y concentración de ácido con la finalidad de mejorar el coeficiente de determinación (R^2) para la regresión lineal en el análisis de la cinética química.
- Se sugiere el análisis individual de la holocelulosa del residuo sólido de la reacción de hidrólisis, para lo cual en próximas experimentaciones es recomendable utilizar una mayor cantidad de muestra inicial.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abril González, M. F. (2016). *Optimización de la reacción de hidrólisis ácida de los residuos de la planta de banano, para mayor rendimiento a glucosa*. [Universidad de Cuenca]. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/25974>
- Aguilar Rivera, N. (2010). Modelo cinético de la hidrólisis del residuo de cosecha cañero. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 20(2), 5-18.
- Álvarez Rodríguez, A. (2013). *Caracterización química de biomasa y su relación con el poder calorífico*. <https://digibuo.uniovi.es/dspace/handle/10651/17777>
- Anecacao. (2015). *Cacao CCN-51*. Anecacao Asociación Nacional de Exportadores de Cacao-Ecuador. <https://anecacao.com/index2022.html>
- Arosemena, A. (2020). Primer semestre 2020. *Anecacao*, 14.
- Barba, F. J., Esteve, M. J., Tedeschi, P., Brandolini, V., & Frígola, A. (2013). A Comparative Study of the Analysis of Antioxidant Activities of Liquid Foods Employing Spectrophotometric, Fluorometric, and Chemiluminescent Methods. *Food Analytical Methods*, 6(1), 317-327. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9441-3>
- Barroso Casillas, M. (2010). *Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería*. [Universidad Politécnica de Madrid]. <https://oa.upm.es/10559/>
- Batista Santana, N., Teixeira Dias, J. C., Passos Rezende, R., Franco, M., SilvaOliveira, L. K., & Oliveira Souza, L. (2018). Production of xylitol and bio-detoxification of cocoa pod husk hemicellulose hydrolysate by *Candida boidinii* XM02G. *PLOS ONE*, 13(4), e0195206. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195206>
- Bayona Albalate, M. (2021). *Pretratamientos físico-químicos de residuos agrícolas para la obtención de biocombustibles*. [Universidad de Zaragoza]. <https://zaguan.unizar.es/record/108857/files/TAZ-TFG-2021-3518.pdf>
- Bellido Díez, C. (2014). *Obtención de bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo: Fermentación conjunta de los Penta y Hexa carbohidratos con *Pichia stipitis**.

<https://doi.org/10.35376/10324/4556>

Benalcázar Bassante, J. C. (2018). *Evaluación de diferentes pretratamientos químicos a la biomasa de la cáscara de cacao para procesos de fermentación alcohólica* [Universidad San Francisco de Quito]. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/8423>

BUN-CA. (2002). *Manuales sobre energía renovable: Biomasa/ Biomass* (Primera). <http://www.bio-nica.info/biblioteca/BUNCA2002Biomasa.pdf>

Cabrera Salazar, E. P., & Chamba Ramírez, K. B. (2022). *Evaluación de la efectividad de los solventes en la eliminación de extractivos y su relación con la caracterización química de bagazo de caña de azúcar* [Universidad de Cuenca]. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/37801>

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. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.022>

Carrasco, F., & Roy, C. (1992). Kinetic study of dilute-acid prehydrolysis of xylan-containing biomass. *Wood Science and Technology*, 26(3), 189-208. <https://doi.org/10.1007/BF00224292>

Casa Iza, E. Y. (2018). *Evaluación del potencial de producción de bioetanol de la biomasa lignocelulosica de la caña de maíz por hidrólisis ácida* [Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15436>

Chávez-Sifontes, M., & Domine, 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.

Cobos, E. (2021, noviembre 3). *Ecuador tiene en el cacao una oportunidad de oro*. Gestión Digital. <https://www.revistagestion.ec/index.php/economia-y-finanzas-analisis/ecuador-tiene-en-el-cacao-una-oportunidad-de-oro>

Díaz-Oviedo, A. F., Ramón-Valencia, B. A., & Moreno-Contreras, G. G. (2022).

Caracterización físico-química de la cáscara de mazorca de cacao como posible uso en la elaboración de tableros aglomerados. *Revista de Investigación, Desarrollo e Innovación*, 12(1), Art. 1. <https://doi.org/10.19053/20278306.v12.n1.2022.14211>

Domínguez, M. M. D., Alvarez-Castillo, A., Castrejón-Rosales, T., Baeza, M. J. G., Campos, F. J. H., Octaviano, V. H. A., & Picazo, J. C. T. (2011). Estudio de la cinética de la hidrólisis ácida de bagazo de caña de azúcar sin pretratamiento para la obtención de azúcares reductores. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 12(3), 153-159.

Ebbing, D. D., & Gammon, S. D. (2010). *Química general* (Novena). Cengage Learning Editores, S.A.

ESIN Consultora S.A. (2014). *Atlas Bioenergético de la República del Ecuador* (Ministerio Coordinador de producción, empleo y competitividad, Ministerio de Electricidad y Energía Renovable, Instituto Nacional de Preinversión).

Espinosa Negrín, A. M., López González, L. M., Casdelo Gutiérrez, N. L., Espinosa Negrín, A. M., López González, L. M., & Casdelo Gutiérrez, N. L. (2021). Pretratamiento de biomásas lignocelulósicas: Breve revisión de los principales métodos utilizados. *Centro Azúcar*, 48(3), 108-119.

García-García, L., Bordallo-López, E., Dopico-Ramírez, D., & Cordero-Fernández, D. (2013). Obtención de celulosa microcristalina a partir del bagazo de la caña de azúcar. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 47(1), 57-63.

Gongora Cauich, J. V. (2016). *Establecimiento de un proceso de hidrólisis a partir de cladodios frescos y secos de nopal (Opuntia spp.) para la obtención de azúcares fermentables* [Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco]. <http://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1023/378>

Herrera-Rengifo, J. D., Villa-Prieto, L., Olaya-Cabrera, A. C., & García-Alzate, L. S. (2020). Extracción de almidón de cáscara de cacao *Theobroma cacao* L. como alternativa de bioprospección. *Revista ION*, 33(2), 25-34. <https://doi.org/10.18273/revion.v33n2-2020002>

- Hosseini Koupaie, E., Dahadha, S., Bazyar Lakeh, A. A., Azizi, A., & Elbeshbishy, E. (2019). Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production-A review. *Journal of Environmental Management*, 233, 774-784. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.09.106>
- INEC. (2021). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua 2020* (p. 49). https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2020/Presentacion%20ESPAC%202020.pdf
- León Villamar, F., Calderón Salazar, J., & Mayorga Quinteros, E. (2016). Estrategias para el cultivo, comercialización y exportación del cacao fino de aroma en Ecuador. *Ciencia Unemi*, 9(18), Art. 18. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol9iss18.2016pp45-55p>
- Li, C., Knierim, B., Manisseri, C., Arora, R., Scheller, H. V., Auer, M., Vogel, K. P., Simmons, B. A., & Singh, S. (2010). Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: Biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*, 101(13), 4900-4906. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.066>
- Li, C., Wang, Q., & Zhao, Z. K. (2008). Acid in ionic liquid: An efficient system for hydrolysis of lignocellulose. *Green Chemistry*, 10(2), 177-182. <https://doi.org/10.1039/B711512A>
- Liao, Y., de Beeck, B. O., Thielemans, K., Ennaert, T., Snelders, J., Dusselier, M., Courtin, C. M., & Sels, B. F. (2020). The role of pretreatment in the catalytic valorization of cellulose. *Molecular Catalysis*, 487, 110883. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2020.110883>
- Loayza Calva, K. N. (2020). *Determinación de las condiciones óptimas de fermentación para la obtención de bioetanol a partir del hidrolizado ácido de la corteza del cacao (Theobroma cacao) proveniente de la industria cacaotera del Ecuador* [Universidad Politécnica Salesiana]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18673>

- Loja Sánchez, C. P. (2016). *Optimización de los residuos de cascarilla de arroz mediante pretratamiento por hidrólisis ácida para la obtención de azúcares reductores*. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/26247>
- Loow, Y.-L., Wu, T. Y., Md. Jahim, J., Mohammad, A. W., & Teoh, W. H. (2016). Typical conversion of lignocellulosic biomass into reducing sugars using dilute acid hydrolysis and alkaline pretreatment. *Cellulose*, 23(3), 1491-1520. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-0936-8>
- Madrid Vicente, A. (2012). *La biomasa y sus aplicaciones energéticas* (Primera). AMV Ediciones.
- Ministerio de Cultura y Patrimonio. (2015, marzo 13). *El intenso color del cacao ecuatoriano*. Ministerio de Cultura y Patrimonio. <https://www.culturaypatrimonio.gob.ec/el-intenso-color-del-cacao-ecuatoriano/>
- Oddoye, E. O. K., Agyente-Badu, C. K., & Gyedu-Akoto, E. (2013). Cocoa and Its By-Products: Identification and Utilization. En R. R. Watson, V. R. Preedy, & S. Zibadi (Eds.), *Chocolate in Health and Nutrition* (pp. 23-37). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-803-0_3
- Oliva Domínguez, J. M. (2003). *Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre «Kluyveromyces marxianus»* [Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/4804/>
- Ortiz, K., & Álvarez, R. (2015). Efecto del vertimiento de subproductos del beneficio del cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre algunas propiedades química y biológicas en los suelos de una finca cacaotera, Municipio de Yaguará (Huila, Colombia). *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 19(1), 65-84. <https://doi.org/10.17151/bccm.2015.19.1.5>
- Oyetuji, S. (2015). Optimization of bioethanol production from cocoa (*Theobroma cacao*) bean shell. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(4), 506-514.

- Peláez Samaniego, M. R., & Espinoza Abad, J. L. (2015). *Energías renovables en el Ecuador. Situación actual, tendencias y perspectivas* (Primera).
- Ribeiro Vasconcelos de Sá, L., de Oliveira Moutta, R., Pinto da Silva Bon, E., Christe Cammarota, M., & Santana Ferreira-Leitão, V. (2015). Fermentative biohydrogen production using hemicellulose fractions: Analytical validation for C5 and C6-sugars, acids and inhibitors by HPLC. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(40), 13888-13900. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.08.014>
- Rodríguez Valiente, I. (2016). *Pretratamiento de hidrólisis hidrotérmica para la degradación de los carbohidratos complejos de residuos de frutas para la obtención de bioetanol* [Universidad de Oviedo]. <https://core.ac.uk/reader/83589964>
- Roy, S., Shukla, L., & Singh, S. (2020). Pre-treatment and value-added products of lignocellulosic waste: A review. *Plant Archives*, Vol 20, 3431-3438.
- Saini, J. K., Saini, R., & Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: Concepts and recent developments. *3 Biotech*, 5(4), 337-353. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>
- Salazar, J. (2016). *Rendimiento de biomasa y valoración nutrimental de residuos por cosecha de cacao (Theobroma cacao L)* [Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/23699/1/tesis%200001%20Ingenier%20C3%ADa%20Agropecuaria%20-%20Alberto%20Salazar-%20cd%200001.pdf>
- Salvachúa Rodríguez, D. (2013). *Producción de etanol de segunda generación a partir de paja de trigo: Hongos, enzimas fúngicas y aplicaciones* [Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/22855/>
- Samah, O. A., Sias, S., Hua, Y. G., & Hussin, N. N. (2011). Production of Ethanol from Cocoa Pod Hydrolysate. *ITB Journal*, 43, 87-94. <https://doi.org/10.5614/itbj.sci.2011.43.2.2>
- Sánchez Quezada, J. P., Soler Herrero, J., & Herguido, J. (2018). Hidrólisis ácida de cáscaras de vaina de cacao CCN-51.: Optimización del proceso para generación de azúcares

- reductores. *Jornada de Jóvenes Investigadores del I3A*, 6. <https://doi.org/10.26754/jji-i3a.201802845>
- Sawatdeenarunat, C., Surendra, K. C., Takara, D., Oechsner, H., & Khanal, S. K. (2015). Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, 178, 178-186. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.103>
- Sigüencia Ávila, J. M., Delgado Noboa, J. W., Posso Rivera, F. R., & Sánchez Quezada, J. P. (2020). Estimación del potencial de producción de bioetanol a partir de los residuos de la corteza del cacao en Ecuador. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 21(3), Art. 3. https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num3_art:1429
- Solarte-Toro, J. C., Romero-García, J. M., Susmozas, A., Ruiz, E., Castro, E., & Cardona-Alzate, C. A. (2019). Techno-economic feasibility of bioethanol production via biorefinery of olive tree prunings (OTP): Optimization of the pretreatment stage. *Holzforschung*, 73(1), 3-13. <https://doi.org/10.1515/hf-2018-0096>
- Titiloye, J. O., Abu Bakar, M. S., & Odetoeye, T. E. (2013). Thermochemical characterisation of agricultural wastes from West Africa. *Industrial Crops and Products*, 47, 199-203. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.03.011>
- Torres, R., Figueroa, E., Medina, S., Zossi, S., & Ruiz, M. (2020). El uso de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en la industria azucarera: Comparación de métodos analíticos para determinar Sacarosa y Azúcares Reductores Totales en melaza. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 97(2), 1-4.
- Turgeon, A., & Morse, E. (2022, mayo 20). *Biomass energy*. National Geographic Society. <https://education.nationalgeographic.org/resource/biomass-energy>
- Tursi, A. (2019). A review on biomass: Importance, chemistry, classification, and conversion. *Biofuel Research Journal*, 6(2), 962-979. <https://doi.org/10.18331/BRJ2019.6.2.3>
- Vriesmann, L. C., de Mello Castanho Amboni, R. D., & de Oliveira Petkowicz, C. L. (2011).

Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): Composition and hot-water-soluble pectins.
Industrial Crops and Products, 34(1), 1173-1181.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.04.004>

6. ANEXOS

Anexo 1. Resultados análisis de cromatografía líquida.

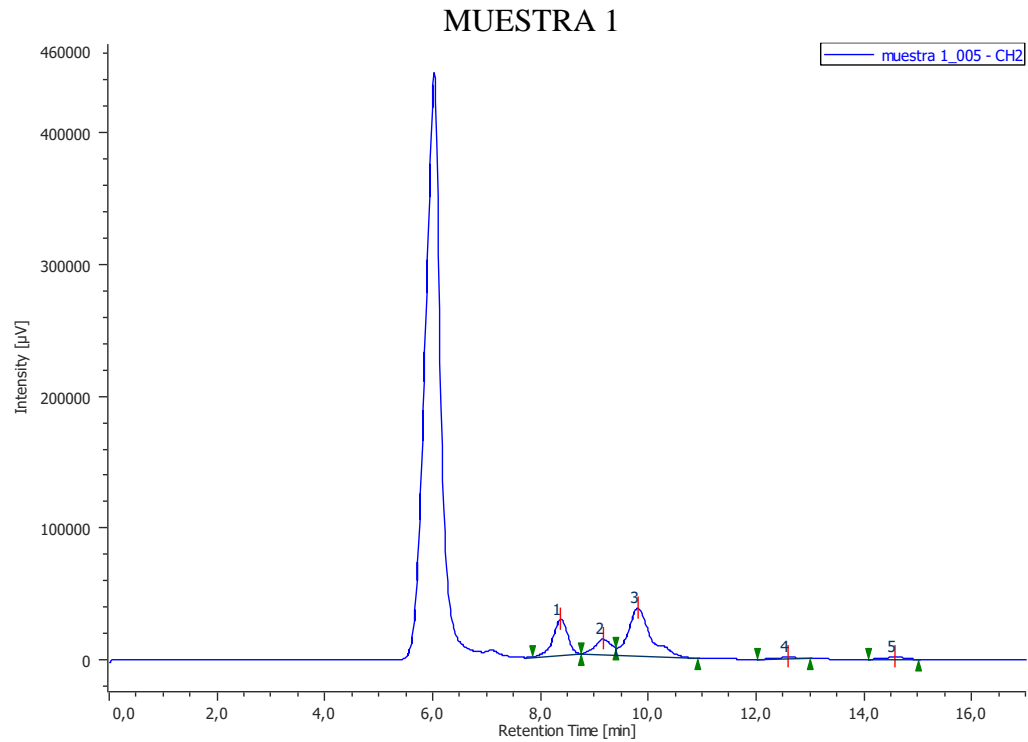


Figura A1.1. Cromatograma del hidrolizado líquido muestra 1 (t=0). *Nota:* Autoría propia.

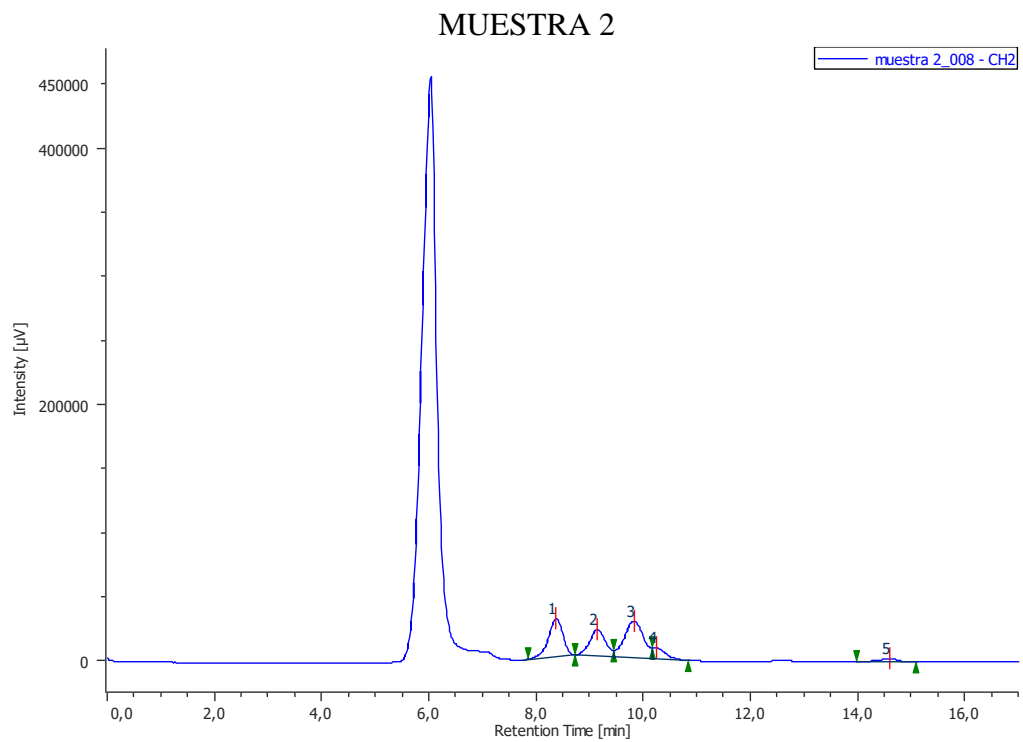


Figura A1.2. Cromatograma del hidrolizado líquido muestra 2 (t=15). *Nota:* Autoría propia.

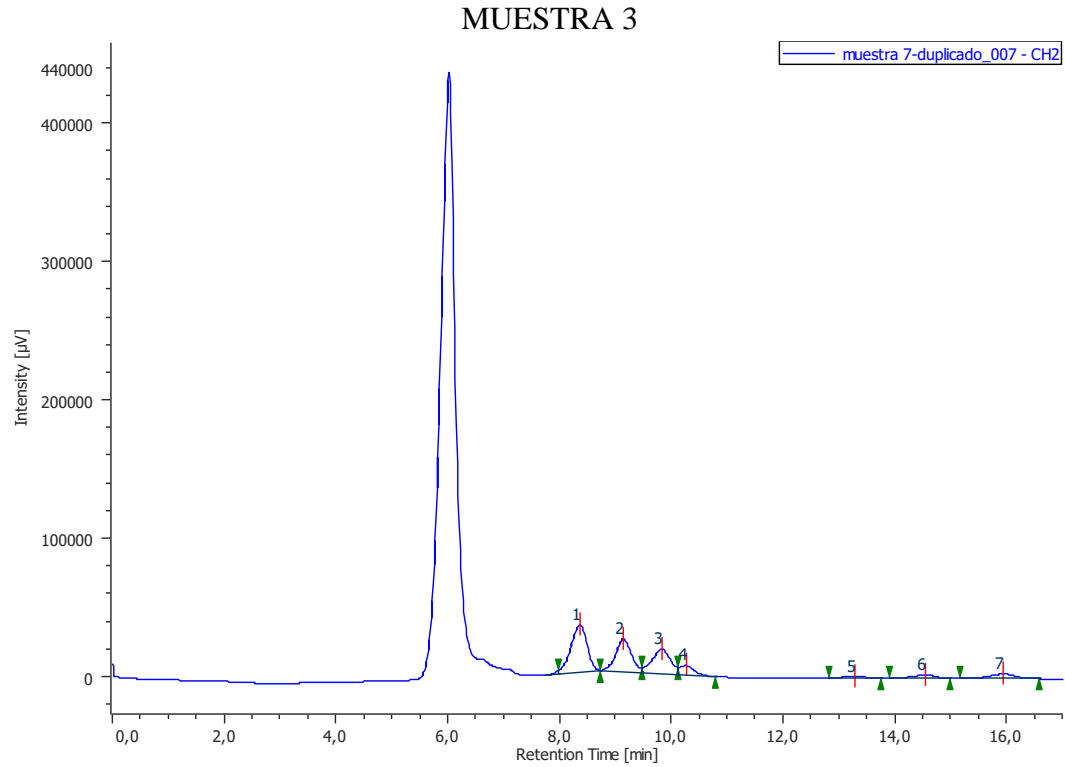


Figura A1.3. Cromatograma del hidrolizado líquido muestra 3 ($t=30$). *Nota:* Autoría propia.

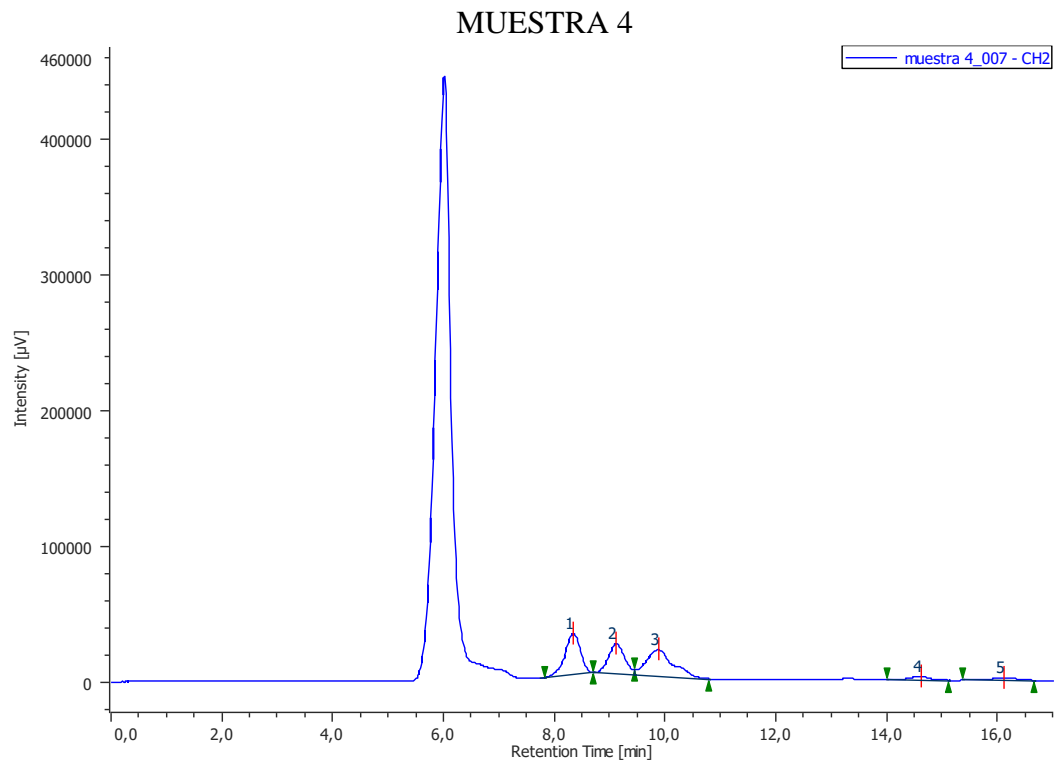


Figura A1.4. Cromatograma del hidrolizado líquido muestra 4 ($t=50$). *Nota:* Autoría propia.

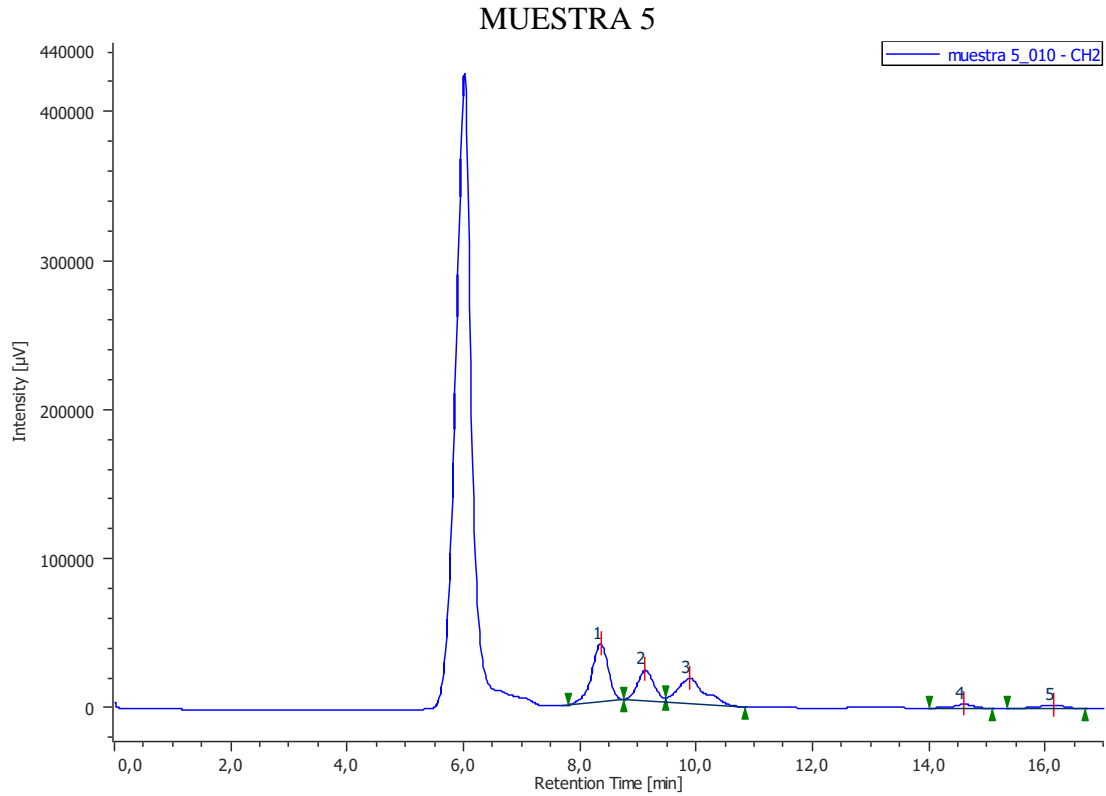


Figura A1.5. Cromatograma del hidrolizado líquido muestra 5 (t=70). *Nota:* Autoría propia.

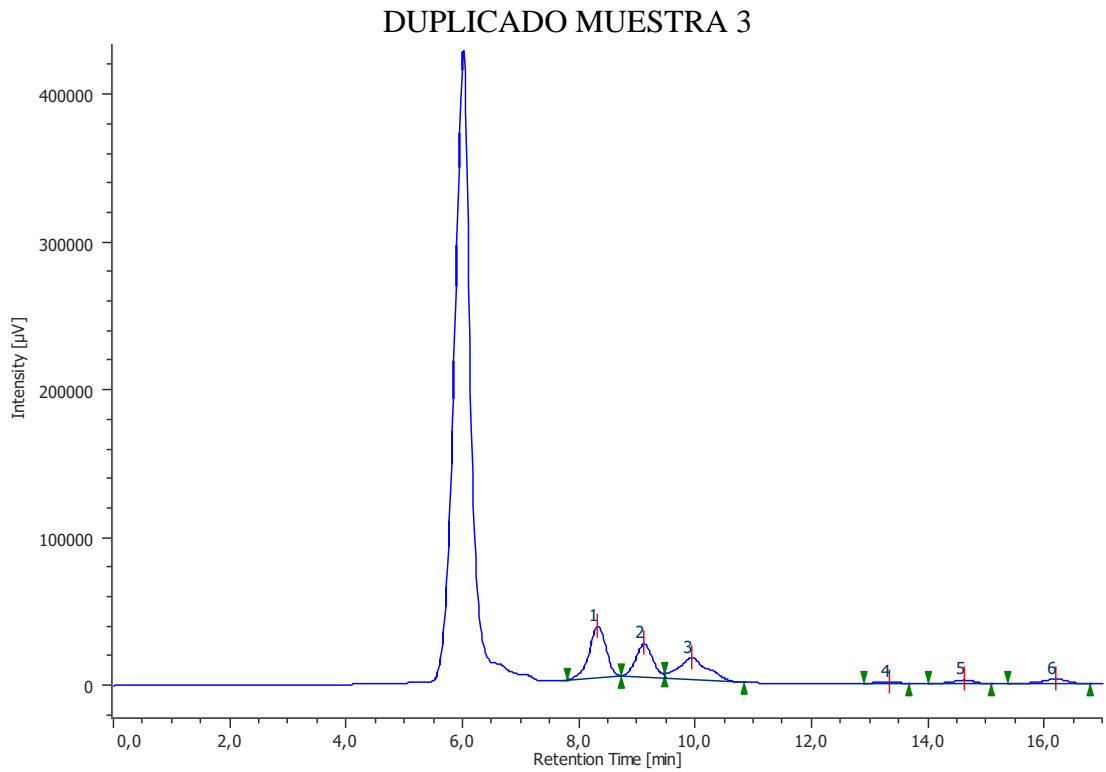


Figura A1.6. Cromatograma del hidrolizado líquido duplicado de muestra 3 (t=30). *Nota:* Autoría propia.

DUPLICADO MUESTRA 5

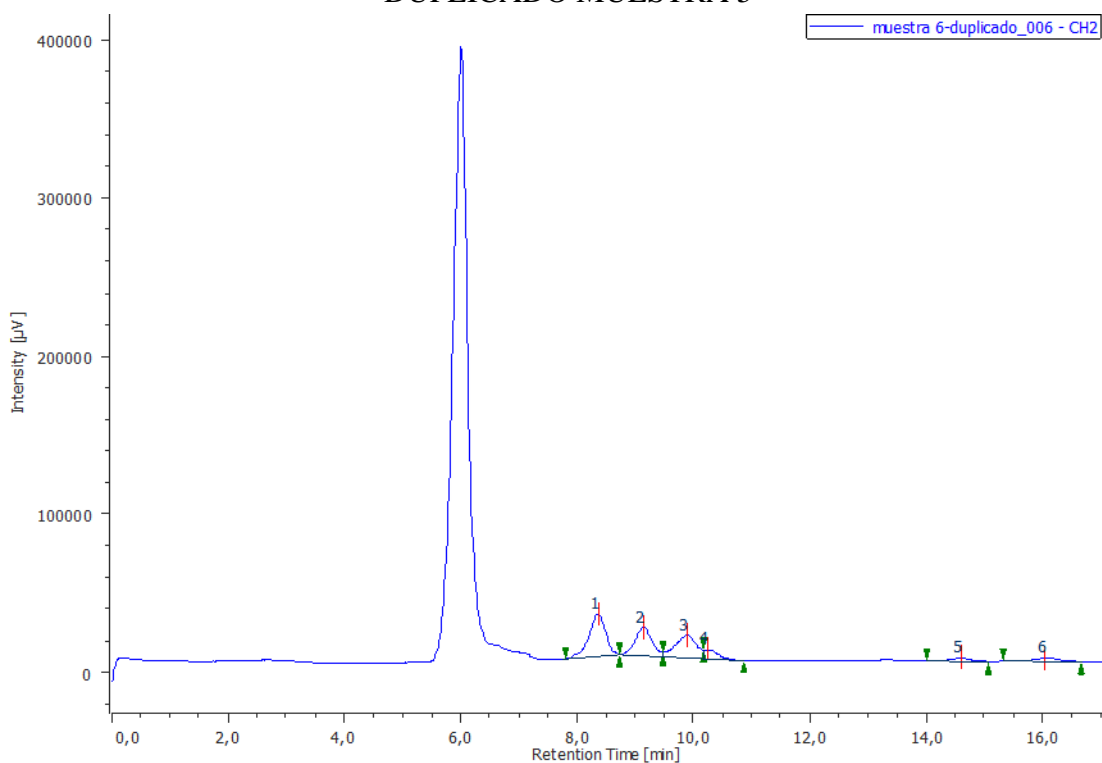


Figura A1.7. Cromatograma del hidrolizado líquido duplicado muestra 5 (t=70). Nota: Autoría propia.

Tabla A1.1. Resultados de cuantificación de glucosa.

| Muestra | Tiempo de retención (min) | Cantidad de glucosa (mg/l) | NaOH 30 % ml (Neutralización) | Total glucosa (mg/l) |
|---------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| 1 (t=0) | 8.367 | 2456.608 | 0.8 | 2947.929 |
| 2 (t=15) | 8.367 | 2577.751 | 0.8 | 3093.301 |
| 3 (t=30) | 8.367 | 3657.189 | 0.8 | 4388.627 |
| 4 (t=50) | 8.367 | 2900.929 | 0.8 | 3481.115 |
| 5 (t=70) | 8.367 | 2854.962 | 0.8 | 3425.955 |
| Duplicado muestra 3 | 8.367 | 3677.674 | 0.8 | 4413.209 |
| Duplicado muestra 5 | 8.367 | 2872.905 | 0.8 | 3447.486 |

Nota: Autoría propia.

Anexo 2. Coeficientes de variación en duplicados.

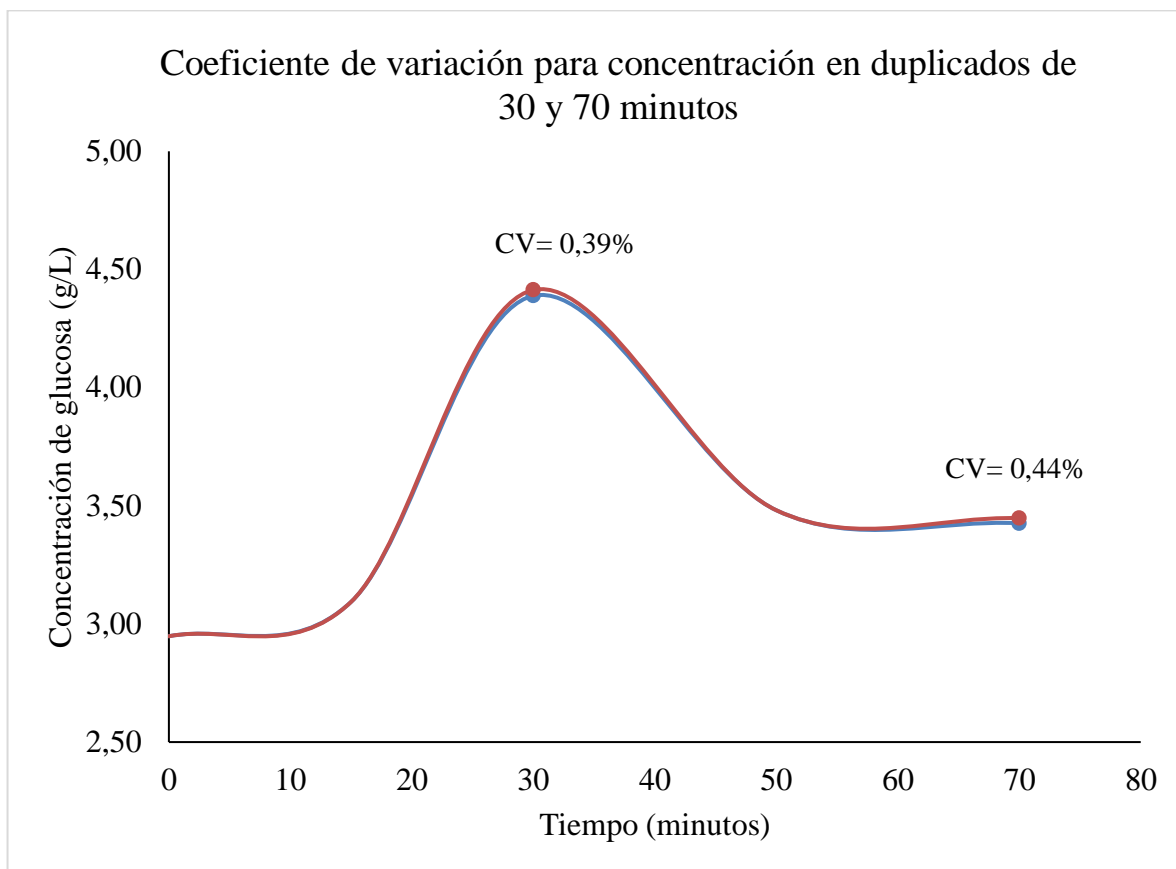


Figura A3.1. Coeficientes de variación para duplicado muestra 3 (t=30) y duplicado muestra 5 (t=70).

Nota: Autoría propia

Anexo 3. Registro fotográfico.



Figura A4.1. Muestreo de las mazorcas de cacao. *Nota:* Autoría propia.



(a)

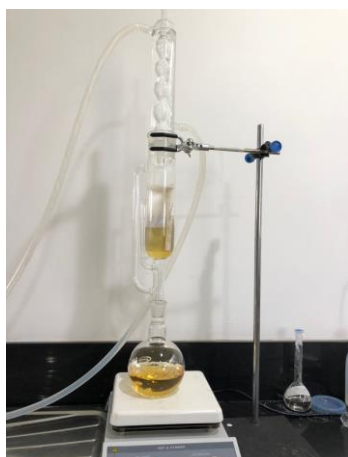


(b)



(c)

Figura A4.2. Pretratamiento de la materia prima: (a) Corte de las mazorcas de cacao. (b) Muestra seca. (c) Tamizado de la muestra. *Nota:* Autoría propia.



(a)



(b)



(c)

Figura A4.3. Eliminación de extraíbles: (a) Extracción en equipo Soxhlet. (b) Lavado del cartucho. (c) Secado del cartucho en la estufa. *Nota:* Autoría propia.

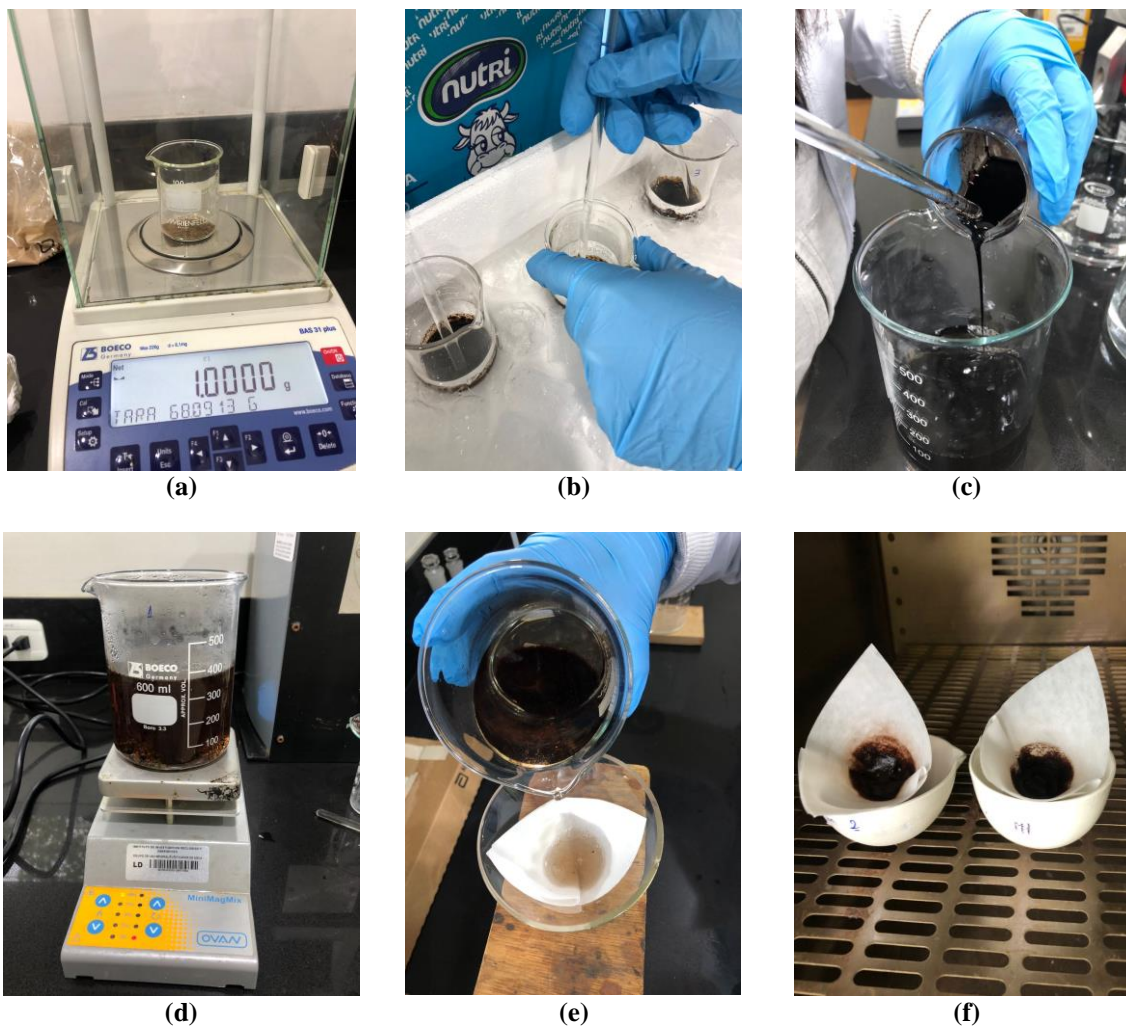
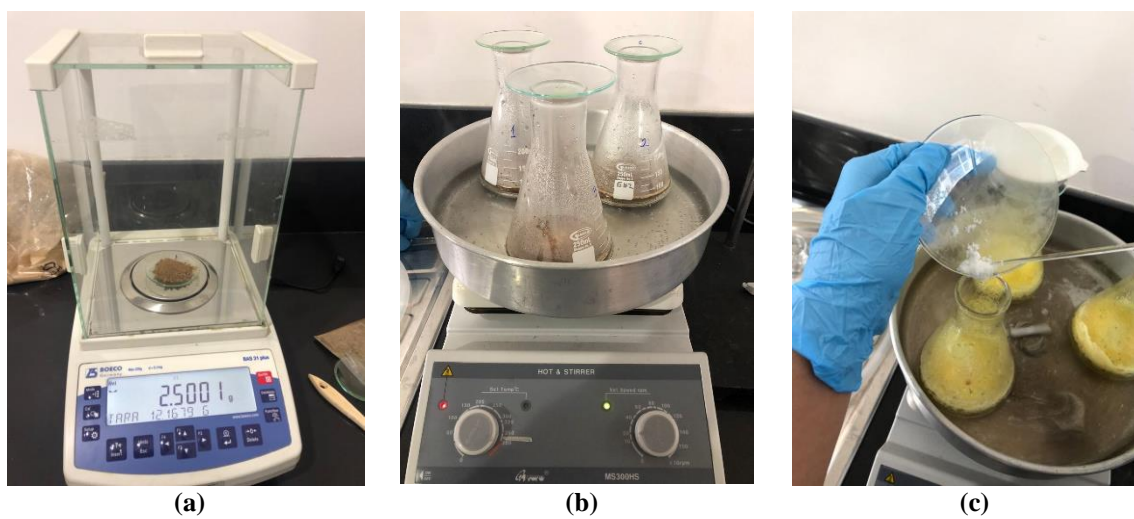


Figura A4.4. Determinación de lignina: (a) Pesado de la muestra. (b) Agitación de la muestra con H_2SO_4 al 72% en el baño a $2\text{ }^\circ\text{C}$. (c) Trasvasado de la muestra. (d) Calentamiento de la muestra. (e) Filtrado. (f) Secado en la estufa. *Nota: Autoría propia.*



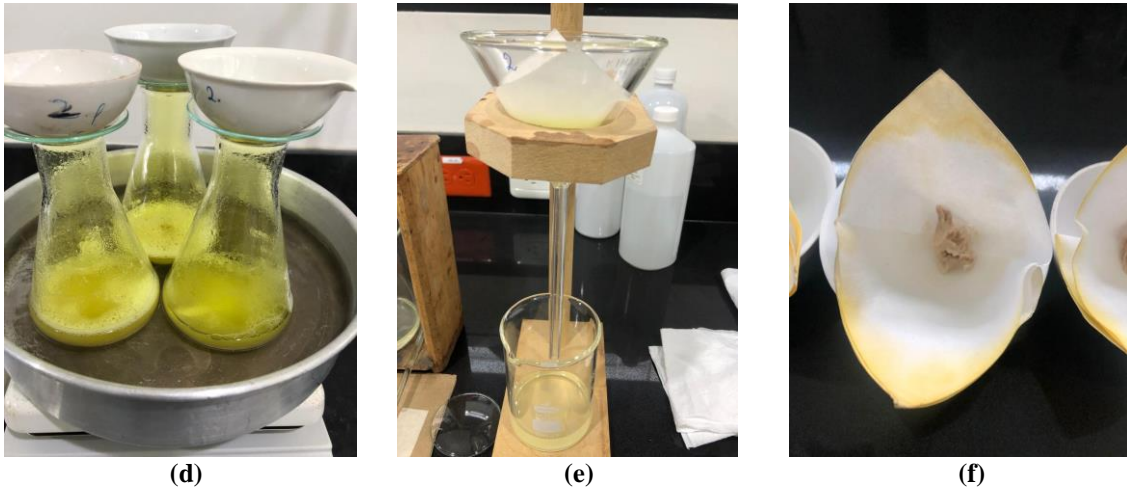


Figura A4.5. Determinación de holocelulosa: (a) Pesado de la muestra. (b) Muestras en baño a 75 °C. (c) Adición de clorito de sodio. (d) Calentamiento. (e) Filtrado. (f) Muestras secas. *Nota:* Autoría propia.

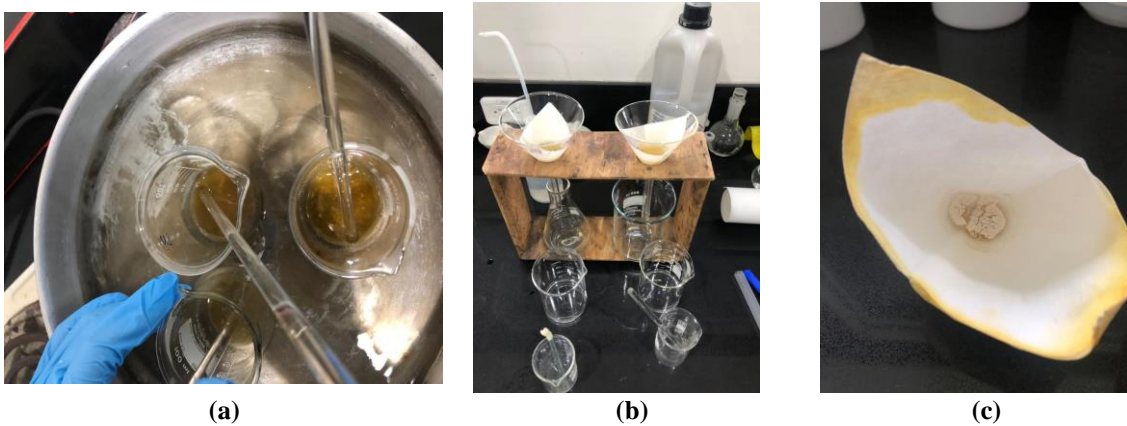
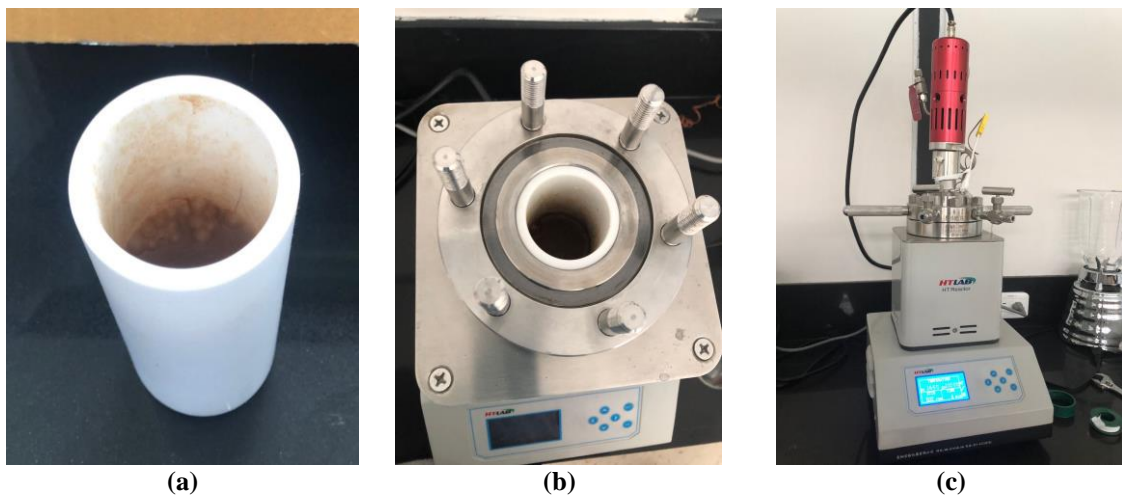


Figura A4.6. Determinación de α -celulosa: (a) Agitación de las muestras. (b) Filtrado. (c) Muestra seca. *Nota:* Autoría propia.



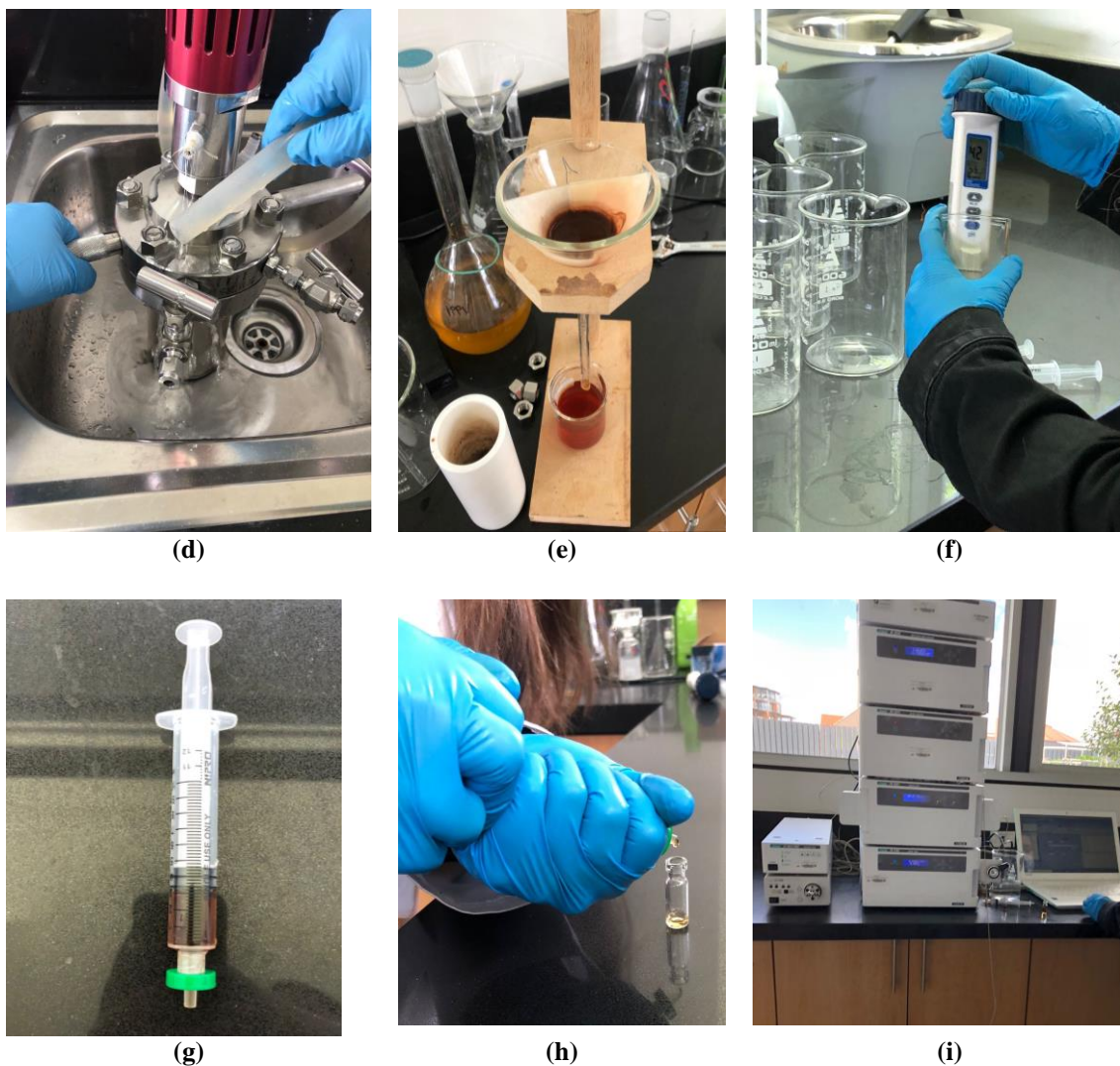


Figura A4.7. Proceso de hidrólisis ácida: (a) Colocación de la muestra en el cilindro de teflón. (b) Colocación del cilindro con muestra dentro del reactor. (c) Programación de condiciones de operación del reactor. (d) Enfriamiento del reactor. (e) Filtrado del hidrolizado. (f) Neutralización del hidrolizado. (g) Filtrado mediante membrana. (h) Toma de muestra para HPLC. (i) Cuantificación mediante HPLC. *Nota:* Autoría propia.

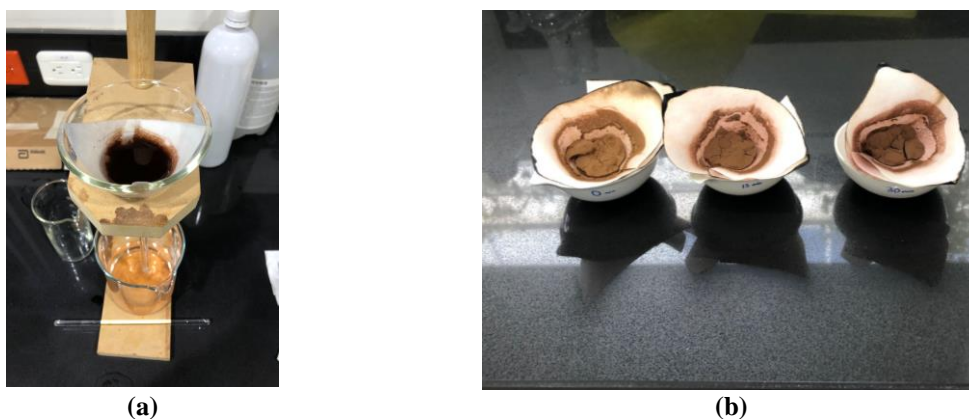


Figura A4.8. Tratamiento del residuo sólido de hidrólisis. (a) Lavado y filtración. (b) Muestra secas. *Nota:* Autoría propia.