

Pretratamientos aplicados a biomásas lignocelulósicas: una revisión de los principales métodos analíticos utilizados para su evaluación

Lignocellulosic biomasses pretreatment: a review of the main analytical methods used in its evaluation

Ana María Espinosa-Negrín^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-8392-162X>

Lisbet Mailin López-González¹ <https://orcid.org/0000-0002-2362-5703>

Neybis Lourdes Casdelo-Gutiérrez² <https://orcid.org/0000-0001-6007-1722>

¹Centro de Estudios de Energía y Procesos Industriales (CEEPI), Universidad de Sancti Spíritus “José Martí Pérez”, Sancti Spíritus, Cuba

²Departamento de Licenciatura Química, Facultad de Química y Farmacia. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Villa Clara, Cuba

*Autor para la correspondencia: amespinosa@uniss.edu.cu

RESUMEN

La identificación del tipo y las mejores condiciones de pretratamiento para procesos de bioconversión de biomásas lignocelulósicas, requiere evaluar los cambios estructurales y composicionales después de su aplicación. En este trabajo se presenta una revisión de los principales métodos empleados para la evaluación de pretratamientos en biomásas lignocelulósicas, haciendo énfasis en los utilizados para mejorar la producción de biogás. Se concluye que los procedimientos modernos que emplean técnicas como la cromatografía para la cuantificación son más exactos, pero muy costosos y trabajosos, por lo que se continúan empleando métodos clásicos, como Weender y Van Soest para el análisis de carbohidratos estructurales y lignina, así como la potenciometría y colorimetría como alternativas atractivas en otras determinaciones. Los cambios cualitativos de sus componentes, así como la

relocalización y forma de interacción entre ellos, es otro aspecto de suma importancia a la hora de interpretar los resultados obtenidos por la aplicación de pretratamientos.

Palabras clave: biomasa lignocelulósica; composición; estructura; pretratamiento.

ABSTRACT

Identifying the type and best lignocellulosic biomass pretreatment conditions for bioconversion processes requires structural and compositional changes evaluating after its application. This paper presents a review of the main methods used for pretreatments evaluation in lignocellulosic biomass, with emphasis in those used to improve biogas production. It is concluded that modern procedures that use techniques such as chromatography for quantification are more accurate, but very expensive and laborious, which is why classical methods, such as Weender and Van Soest for the analysis of structural carbohydrates and lignin, continue to be used, and potentiometry and colorimetry results attractive alternatives in other determinations. The qualitative changes of its components, such as relocation and the way in which they interact, is another important aspect when interpreting results obtained by applying pretreatments.

Keywords: composition; lignocellulosic biomass; pretreatment; structure.

Recibido: 20/9/2021

Aprobado: 2/12/2021

Introducción

La biomasa lignocelulósica es uno de los recursos orgánicos más abundantes a nivel mundial, y constituye una fuente prometedora para la obtención de energía renovable y bioproductos⁽¹⁾; es considerada una alternativa a las fuentes fósiles de carbono como el petróleo, gas natural y carbón, y tiene una importante aplicación en la producción de polímeros, fertilizantes, etc.⁽²¹⁾ Su composición varía según la fuente (por ejemplo: maderas duras, maderas suaves, residuos de la agricultura y cultivos energéticos), y está afectada por su origen, edad, condiciones climáticas, y por los procesos de cosecha y almacenamiento. Está conformada por tres componentes poliméricos mayoritarios que se encuentran entrelazados:

celulosa, hemicelulosa y lignina, además de extractables y numerosos materiales inorgánicos.⁽³⁾

La celulosa y la hemicelulosa son polisacáridos que pueden convertirse en compuestos químicos a base de furanos y en ácidos orgánicos por vías termoquímicas. También pueden transformarse a bioetanol, biobutanol, biogás y otros productos de fermentación a través de varias vías biológicas. En los procesos de conversión biológica para la obtención de estos productos, diferentes propiedades de la biomasa como la composición química, el peso molecular de la lignina, la cristalinidad, el grado de polimerización y la accesibilidad de la celulosa, ocasionan su recalcitrancia.⁽⁴⁾

Se ha reportado que una delignificación de la biomasa reduce las barreras físicas y químicas, e incrementa la accesibilidad de la celulosa, con lo que se logra mejorar su bioconversión. También la modificación en la estructura de la lignina mejora la sacarificación enzimática de la biomasa, aun cuando no se logra una remoción significativa de la misma.⁽⁴⁾

Dichas modificaciones se pueden obtener al realizar un paso de pretratamiento previo a la etapa de hidrólisis, que puede ser químico, físico, físico-químico y biológico.⁽⁵⁾ Este proceso es principalmente utilizado para incrementar la producción de biogás y etanol; sin embargo, también puede emplearse para mejorar el rendimiento en la producción de todos los bioquímicos obtenidos a partir de lignocelulosas, así como en la obtención de oligosacáridos para la alimentación animal.⁽⁶⁾

La gran variedad de materiales lignocelulósicos hace difícil encontrar un diseño general del proceso para todas las materias primas. La recalcitrancia de las maderas suaves es mucho mayor que la de la mayoría de los cultivos y residuos agrícolas y herbáceos. Por lo tanto, la selección del “mejor método de pretratamiento” no es tarea fácil. Su selección depende en gran parte de la aplicación final, y cualquier recomendación debe basarse en una minuciosa evaluación técnico-económica en la que los datos hayan sido recolectados, al menos, a escala piloto.⁽²⁾

Uno de los desafíos en la selección del pretratamiento es evaluar el efecto de los diferentes métodos. Por ejemplo, si el propósito es producir etanol o biogás, se pueden emplear varios indicadores para evaluar el material pretratado, entre ellos la estimación de los niveles de compuestos tóxicos o inhibitorios que pueden causar un detrimento en procesos de hidrólisis enzimática y fermentación. Por otro lado, si el propósito es producir polímeros, geles o aglutinantes, otros criterios de evaluación deben ser empleados, como la fuerza mecánica y las propiedades de hinchamiento en el caso de los polímeros.⁽²⁾

El efecto del pretratamiento no solo depende de la biomasa empleada y el tipo de pretratamiento, sino de las condiciones que se utilizan (tiempo, temperatura, etc.), que constituyen también parámetros a optimizar. Este trabajo tiene como objetivo presentar una revisión de los principales métodos analíticos utilizados para la evaluación de las técnicas de pretratamiento empleadas en biomásas lignocelulósicas, así como otros métodos alternativos que pudieran ser empleados con este fin.

Desarrollo

Varios análisis han sido desarrollados para evaluar el efecto de pretratamientos aplicados a biomásas lignocelulósicas, y para describir las mejoras en los procesos de hidrólisis enzimática o microbiana /6/, los cuales son necesarios en la obtención de productos como el biogás y el etanol. Entre los principales aspectos a tener en cuenta para ambos casos se encuentran los cambios en la composición, estructura, cristalinidad y formación de sustancias tóxicas e inhibitorias. En el caso específico de la obtención de biogás existen investigaciones que evalúan el grado de solubilización de la biomasa, expresado como la demanda química de oxígeno y los ácidos grasos volátiles (figura 1).⁽⁷⁻⁸⁾

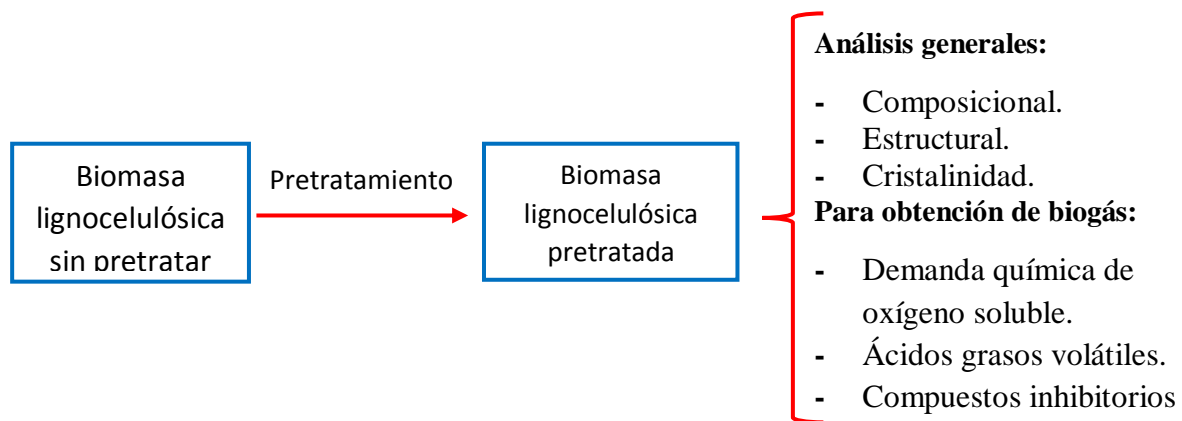


Fig. 1- Principales análisis realizados a biomásas lignocelulósicas pretratadas para obtención de biogás. Fuente: Adaptado de Karimi y colaboradores ⁽⁶⁾

Específicamente para el estudio de la composición de la biomasa lignocelulósica se utiliza, fundamentalmente el método de Van Soest, basado en el uso de detergentes para fraccionar la fibra y conservar la lignina en el análisis de forrajes, los métodos para determinar parámetros

en los procesos relacionados al sector del biogás propuestos por el Centro de Investigación de Biomasa de Alemania (German Biomass Research Center) y los Procedimientos Analíticos Estándares para Biomasa empleados en Estados Unidos ⁽⁹⁾, desarrollados estos últimos por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable (National Renewable Energy Laboratory, NREL), quien ha desarrollado un conjunto de procedimientos analíticos para caracterizar la biomasa lignocelulósica e investigar los cambios composicionales, químicos y estructurales después de un pretratamiento, y su efecto en la hidrólisis enzimática, enfocados en la conversión de biomasa a biocombustibles (biogás/bioetanol). Estos procedimientos incluyen la determinación de ST, SV y cenizas, el contenido de proteína, azúcares y sus productos de degradación, y el análisis de carbohidratos y lignina.⁽¹⁰⁾

Sólidos totales, sólidos volátiles y cenizas

Las muestras de biomasa pueden contener cantidades grandes y variables de humedad, que pueden cambiar muy rápido cuando se exponen al aire, por lo que los resultados de los análisis de su composición química se reportan típicamente en base al peso de la muestra seca, que permite la comparación de muestras en una base consistente /10/, además, se ha demostrado que el contenido de **ST** guarda relación con el rendimiento de biogás obtenido para diferentes sustratos.⁽¹¹⁾

Los ST constituyen el residuo que se obtiene en el recipiente al evaporar a sequedad una cantidad de muestra determinada.⁽¹²⁾ Durante este procedimiento se elimina el agua de la materia fresca, aunque para sustratos con una fracción significativa de SV (como forrajes) se debe considerar la pérdida de compuestos orgánicos durante el secado.⁽¹³⁾ Se han realizado propuestas para corregir el contenido de ST en diversos materiales, como la remolacha azucarera, a través de ecuaciones que consideran el pH, el contenido de ácidos orgánicos, alcoholes de bajo peso molecular y ácido láctico.⁽¹⁴⁾ A temperaturas de 103-105°C, la pérdida de materia orgánica por volatilización es generalmente escasa, aunque sí puede influir en la sobreestimación del rendimiento de metano en procesos de digestión anaerobia. Angelidaki y colaboradores ⁽¹⁵⁾ recomiendan para materiales con alto contenido en AGV incrementar el pH para decrecer su volatilidad durante la determinación de ST o trabajar a 90 °C.

Al someter el residuo del análisis de ST a ignición a 550 °C, los componentes orgánicos se oxidan y se obtiene una fracción inerte conocida como cenizas. En muestras lignocelulósicas hay dos tipos de ceniza: no extraíbles y extraíbles. Las primeras son los materiales inorgánicos enlazados a la estructura; y las extraíbles, los que se adhieren a la biomasa y se

eliminan por lavado con agua; su forma típica es el suelo.⁽¹⁶⁾ En lignocelulosas con alto contenido de cenizas (más de 10 %), el análisis de lignina y carbohidratos fibrosos propuesto por Sluiter y colaboradores⁽¹⁷⁾ no es adecuado, pues pueden neutralizar una parte del ácido sulfúrico y afectar considerablemente los resultados analíticos.

Al sustraer la masa de la fracción inerte de la masa inicial de ST se obtiene el contenido de SV⁽¹⁸⁾, que representa una aproximación de la fracción orgánica presente en el sustrato.⁽¹³⁾

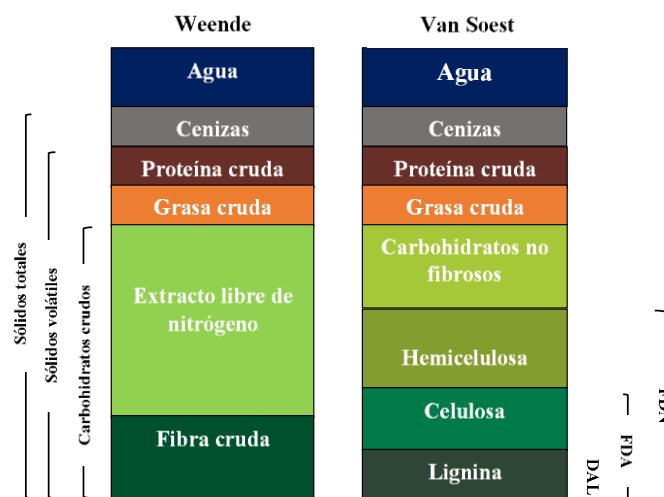
Separación de las fracciones líquida y sólida

Al someter una muestra a pretratamiento, las fracciones sólida y líquida deben ser separadas para los análisis posteriores; esto puede lograrse por filtración a vacío o por centrifugación, donde se recomienda trabajar a velocidades de 6 000 rpm por 15-30 min.⁽¹⁹⁾ La FS ya separada debe ser lavada con agua o pequeñas cantidades de detergente, y volverse a filtrar, y luego se realiza el secado.^(20, 21)

Determinación de la composición química. Carbohidratos fibrosos

Varios investigadores han desarrollado aproximaciones para estimar la composición de diferentes sustratos. La determinación analítica se basa, típicamente en el análisis proximal (método Weender) y el método de los detergentes de Van Soest (figura 2).⁽¹³⁾

El sistema de análisis de Weender es un método gravimétrico que consiste en colocar una muestra secuencialmente en reflujo en base diluida (NaOH), seguido por ácido diluido (H₂SO₄), aunque se han realizado modificaciones en los últimos años que reportan el uso inicial del ácido y luego de la base, también diluidos al 1,25 %.⁽²²⁾ El residuo resultante se conoce originalmente como fibra cruda, que actualmente se sabe que está compuesto principalmente por celulosa y proporciones variables de polisacáridos no celulósicos y de lignina. Según Weender, la FC representaba la fracción menos digerible de los alimentos, y el extracto libre de nitrógeno la de los carbohidratos más digeribles, lo cual conducía a resultados erróneos⁽²³⁾, aunque este método sigue siendo empleado en el análisis composicional de biomásas lignocelulósicas que son sometidas a pretratamiento⁽⁷⁻²⁴⁾, además de su uso en la evaluación de la calidad nutritiva y digestibilidad de los forrajes.⁽²⁵⁻²⁶⁾



Fuente: Weinrich y colaboradores /13/

Fig. 2- Componentes del análisis de Weender y Van Soest de nutrientes característicos

La propuesta de Van Soest se basó sobre el uso de detergentes, debido a la capacidad que tienen algunos (como el laurilsulfato de sodio) de solubilizar proteínas, así como la propiedad de algunos compuestos de amonio cuaternario (como el bromuro de cetiltrimetilamonio) para disolver polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Según Van Soest, estos compuestos servirían para fraccionar la fibra conservando la lignina. Van Soest declaró que de la FDN hacen parte la hemicelulosa, celulosa, lignina y otros componentes (combinaciones de nitrógeno con hemicelulosas y lignina con celulosa, proteína y otros). Para la FDA sus principales constituyentes serían los mismos que para la FDN, excepto la hemicelulosa (figura 2). Este método sigue siendo utilizado para el análisis de compuestos lignocelulósicos pretratados ^(24, 27, 28), aunque se deben tener en cuenta varios aspectos para llevar a cabo el análisis (tabla 1).⁽²⁹⁾ También se ha reportado el uso de este método como una segunda etapa después de realizado el análisis de proteína y grasa cruda, carbohidratos no fibrosos y fibra cruda, determinados por el método de Weender en biomásas lignocelulósicas antes de someterse a digestión anaerobia.^(30, 31)

Otra de las vías para la cuantificación de carbohidratos estructurales y lignina es la propuesta por Sluiter y colaboradores ⁽¹⁷⁾, basada en una hidrólisis ácida de dos etapas. La biomasa se somete, en primer lugar, a hidrólisis con ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 72 %, seguido de dilución de la mezcla para obtener hidrólisis con H₂SO₄ al 4 % a 120 °C en un recipiente sellado. Después la mezcla se neutraliza por encalado, y los azúcares simples y los grupos acetilo liberados son determinados por HPLC. En este método, la lignina se clasifica como fracciones

AIL y ASL. El material soluble en ácido es la fracción de lignina que tiene un peso molecular bajo, la cual se solubiliza en la hidrólisis ácida y se determina por espectrofotometría UV-Visible. La lignina insoluble en ácido, por otra parte, es la de peso molecular elevado que no puede ser disuelta durante la hidrólisis y se mide gravimétricamente. Este tipo de lignina se determina por la filtración de los materiales después de la hidrólisis ácida, secado a 105 °C, y calcinado a 575 °C.⁽¹⁷⁾ Este método es sencillo y ha sido empleado por varios autores para evaluar la influencia de los pretratamientos en biomásas lignocelulósicas ^(32, 24); sin embargo, se debe prestar especial atención para obtener resultados confiables (tabla 1).

Tabla 1- Ventajas y desventajas de los diferentes tipos de análisis de fibra

Método	Ventajas	Desventajas	Consideraciones
Weender	Análisis simple, no requiere de equipamiento sofisticado.	Se remueven polisacáridos no celulósicos y lignina, de los que se recupera solo una pequeña porción, y se elimina hemicelulosa.	Necesidad de realizar una extracción previa con éter. Reemplazar el agua que se va evaporando durante las ebulliciones. Lavado adicional del residuo de la segunda ebullición tanto con agua como con alcohol y éter.
Van Soest	Método de análisis simple. No requiere de equipamiento especial.	Sobreestima el contenido de celulosa y hemicelulosa por posible presencia de proteínas en la FDN y la pérdida de lignina en la FDA.	Uso de sulfito de sodio para disminuir los niveles de proteína en el análisis de FDN, pero no debe ser utilizado en análisis secuenciales que impliquen determinar lignina. En estos casos debe cuantificarse las proteínas. Un contenido de lípidos superior al 10 % interfiere ya que los detergentes son más solubles en ellos que en agua. Uso de α -amilasa para degradar el almidón, aunque esta enzima puede presentar actividad hacia otros carbohidratos, por lo que también se puede utilizar 2-etoxietanol o trietilenglicol a igual concentración.
Técnica propuesta por Sluiter y colaboradores /17/	Método sencillo	Requiere de equipamiento especial (HPLC).	Secar las muestras antes del análisis (la humedad diluye el ácido añadido). El tamaño de partícula, muestreo e impurezas como proteínas y suelo, pueden afectar altamente los resultados.

Determinación de proteínas

Las proteínas constituyen una interferencia en la determinación de lignina; por lo tanto, para su determinación exacta en los materiales lignocelulósicos con cantidades considerables de proteínas, su cuantificación es esencial.⁽³⁵⁾ En el método presentado por Sluiter y colaboradores ⁽¹⁷⁾, las proteínas no hidrolizadas dan lugar a una sobreestimación de la lignina. Estas pueden determinarse simplemente mediante la medición del contenido de nitrógeno (por ejemplo, por el método Kjeldahl) y luego se estima el contenido de proteína utilizando un Factor Nitrógeno apropiado (factor N).⁽⁶⁾ Se han publicado varios métodos que recomiendan

el uso de un factor de 6,25 para todo tipo de biomasa, excepto en granos de trigo donde se recomienda un factor de 5,7 ⁽³⁵⁾; también se ha determinado el factor nitrógeno para otros tipos de biomasa. El nitrógeno determinado por este método es la suma de nitrógeno orgánico e inorgánico ⁽³⁶⁾ y ha sido utilizado en la determinación de nitrógeno y proteínas para la evaluación de pretratamientos ⁽¹⁹⁾, aunque existen otras técnicas para determinar el contenido de proteínas, más comúnmente empleadas en bioquímica, como el método de Lowry, Bradford, BCA y otros.⁽³⁷⁾

Determinación de carbohidratos no estructurales

Dos tipos de carbohidratos pueden estar disponibles en la biomasa: estructurales y no estructurales. Los carbohidratos que están unidos en la biomasa se llaman estructurales, y los que se pueden eliminar por extracción o lavado se llaman no estructurales. El método de Sluiter y otros ⁽¹⁷⁾ es adecuado para carbohidratos estructurales, pero no para los no estructurales. Por ejemplo, cuando el sorgo o caña de azúcar, con un poco de azúcar residual, se somete al análisis, los azúcares libres deben primero ser analizados y removidos.

Estos carbohidratos no estructurales son polisacáridos constituidos principalmente por subunidades monoméricas de glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa y manosa. Durante ciertos pretratamientos de biomasa, una parte de estos polisacáridos se hidroliza y se liberan azúcares solubles a la FL.⁽³⁸⁾

En la tabla 2 se muestran varios métodos utilizados para el análisis de monosacáridos y carbohidratos **no estructurales** en biomasas lignocelulósicas: refractometría, colorimetría, metanólisis, CG, HPLC, cromatografía gas-líquido, cromatografía de intercambio aniónico (AEC), cromatografía de intercambio aniónico de alto pH con detección de pulso amperométrico (HPAE/PAD), espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H), de infrarrojo cercano (NIR), análisis termogravimétrico (TGA), y electroforesis capilar (CE).⁽⁶⁾ En la evaluación de las técnicas de pretratamiento se han utilizado fundamentalmente CG ⁽¹⁹⁾ y HPLC.⁽³⁹⁾

Tabla 2- Principales métodos utilizados en el análisis de azúcares

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

Sluiter y colaboradores ⁽³⁸⁾ proponen un método para cuantificar la cantidad total de carbohidratos solubles, así como la cantidad de azúcares monoméricos liberados en solución. Los azúcares solubles en la FL de las muestras procesadas se pueden cuantificar mediante HPLC con detección del índice de refracción. Si los azúcares están presentes en forma oligomérica, se requiere un procesamiento adicional en sus unidades monoméricas antes del análisis. Los métodos de CG y HPLC son muy útiles para la determinación de monosacáridos en la FL, pero también son muy costosos y trabajosos, por lo que el uso de técnicas más sencillas como la colorimetría, constituye una alternativa para la cuantificación de carbohidratos no estructurales.

El método de fenol-ácido sulfúrico o de Dubois ha sido uno de los métodos más utilizados para la determinación de carbohidratos totales por espectrofotometría.⁽⁴⁰⁾ Este se basa en la deshidratación de azúcares por acción de H₂SO₄ para formar furfural e HMF, que posteriormente reaccionan con el fenol para formar un compuesto coloreado que permite la cuantificación por espectrofotometría UV-Visible a una longitud de onda de 490 nm. Constituye un método sensible y ofrece resultados reproducibles, aunque investigaciones recientes han demostrado que no es necesario el uso del fenol, sino solo la hidrólisis con H₂SO₄ concentrado y la medición a 315 nm.⁽⁴¹⁾

El método de Miller es uno de los más empleados en la determinación de azúcares reductores debido a su bajo costo y toxicidad de los reactivos, alta sensibilidad y productividad, por lo que ha sufrido varias modificaciones a través de los años para adecuarse al análisis de diferentes materiales.⁽⁴⁰⁾ Se basa en la reacción de los grupos reductores de los azúcares con el DNS. El DNS se reduce formando el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, mientras que el grupo aldehído se oxida para formar un grupo carboxilo. La lectura para la cuantificación se realiza a una longitud de onda de 540 nm.⁽⁴²⁾ Este método ha sido empleado en la evaluación de pretratamiento alcalino en rastrojo de maíz.⁽³²⁾

La cuantificación de los azúcares no reductores se puede determinar por diferencia entre los azúcares totales y los azúcares reductores.⁽⁴⁰⁾ Estos métodos colorimétricos constituyen una alternativa al uso de técnicas más costosas y resultan rápidos y confiables.

Separación de los extractivos en fracción sólida

Los extractivos son una mezcla de diferentes productos químicos: resinas, proteínas, fitosteroles, grasas, ceras, sales, azúcares libres y una serie de hidrocarburos no volátiles en porciones menores. Estos compuestos interfieren en el análisis de lignina, por lo que deben extraerse primero para obtener resultados aceptables. Por ejemplo, la corteza de un pinar, la cual contiene un 19 % de extractivos, se analizó utilizando el método de Sluiter y colaboradores⁽⁴³⁾, con y sin la separación de extractivos /44/. El contenido de lignina cuando los extractivos no se separaron fue superior en un 50 % respecto a cuando se realizó la extracción previa (material 6, tabla 3).

Tabla 3- Influencia de un paso de extracción en el contenido de lignina de la biomasa original (expresado como por ciento en base seca)

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

Fuente: adaptado de Burkhardt y colaboradores⁽⁴⁴⁾

Un método simple y estandarizado, sugerido en el Método Estándar de Análisis para la Determinación de Extractivos Etanólicos en Biomasa (ASTM E1690) y modificado por Sluiter y colaboradores ⁽⁴³⁾, se utiliza ampliamente para el análisis de materiales pretratados para biocombustible. De acuerdo con este método, los extractivos son simplemente extraídos en un extractor Soxhlet por agua o un disolvente, generalmente etanol. Los materiales inorgánicos y nitrogenados, como ácidos de azúcares y azúcares no estructurales pueden ser extraídos por el agua, mientras que materiales cerosos y aceitosos pueden ser extraídos por etanol.⁽⁴³⁾

Otra de las sustancias que interfiere en el análisis de compuestos lignocelulósicos es el almidón, que se hidroliza a glucosa en condiciones menos severas que la celulosa. Bajo las condiciones de hidrólisis presentadas por Sluiter y otros ⁽¹⁷⁾, el almidón se convierte en glucosa, pero una parte de esta se descompone en otros productos, como el 5-hidroximetilfurfural, por lo que se requiere una hidrólisis separada para el análisis de almidón, que puede ser por vía enzimática con α -amilasa ⁽⁴⁵⁾; luego, el contenido de almidón puede ser restado del total de glucanos.

Determinación de la Demanda Química de Oxígeno Soluble

La Demanda Química de Oxígeno (DQO) se define como la cantidad de un oxidante específico que reacciona con la muestra en condiciones controladas. Los componentes orgánicos e inorgánicos de una muestra están sujetos a oxidación, pero en la mayoría de los casos predomina el componente orgánico.⁽⁴⁶⁾ Similar a los SV, es una medida para los componentes del sustrato orgánico, pero generalmente se utiliza para la evaluación de muestras muy diluidas en el análisis de aguas residuales. Durante la digestión anaerobia de sustratos altamente diluidos con una alta proporción de sustancias volátiles (por ejemplo, filtración), también se utiliza la DQO, ya que ningún resultado se reporta en base a los ST.⁽⁴⁷⁾ Cuando se realiza un pretratamiento, se determina la DQOs, que se corresponde con el valor de DQO de la FL, para evaluar su efecto en la solubilización de la materia orgánica. Su determinación se puede realizar por vía volumétrica o colorimétrica.

Ambos métodos se basan en la reacción de una cantidad de muestra con un oxidante energético, como el dicromato de potasio, en medio ácido sulfúrico con el ion plata (Ag^+) como catalizador. En el caso de la volumetría, la determinación se realiza por valoración del exceso de dicromato no reducido, y la materia oxidable se calcula en términos de equivalente de oxígeno. En el caso de la colorimetría la determinación se realiza después de finalizada la

digestión, pues se produce la reducción del Cr^{6+} del ion dicromato a Cr^{3+} (verde), que absorbe en la región de los 600 nm, donde el dicromato tiene absorción casi nula. Para DQOs en el rango 100-900 mg/L, se determina el incremento en Cr^{3+} a 600 nm, y valores más altos pueden ser obtenidos por dilución.⁽⁴⁶⁾ Existen equipos que realizan la digestión y también la determinación de manera rápida y sencilla ⁽³²⁾, pero se puede realizar la digestión en un bloque de calentamiento y luego ejecutar la lectura en un espectrofotómetro.

Determinación de ácidos grasos volátiles

Los AGV, principalmente el ácido acético, pueden estar contenidos en la biomasa sin pretratar, aunque también son subproductos de algunos pretratamientos, como en el pretratamiento por agua caliente presurizada. Aquí el ácido acético obtenido por la hidrólisis del grupo O-acetil contenido en la hemicelulosa, genera iones H^+ , que incrementan la eficacia del pretratamiento solubilizando prácticamente toda la hemicelulosa y parte de la lignina.⁽⁴⁸⁾ En pretratamiento de cachaza con NaOH ,⁽⁴⁹⁾ encontró como AGV mayoritarios los ácidos acético y butírico, mientras que en el pretratamiento termoalcalino de la cachaza con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ realizado por López González ⁽⁵⁰⁾, el ácido acético fue el único identificado. Su generación depende principalmente de la temperatura, el tiempo de pretratamiento y la carga de álcalis empleada en esos casos.

Existen diversos métodos para la determinación de AGV: destilación, espectrofotometría ⁽⁵¹⁾, GC ^(30, 52), HPLC ⁽⁵³⁾, siendo este último el más empleado en la evaluación del efecto de las técnicas de pretratamiento. También se puede realizar el análisis de ácidos orgánicos volátiles en la FL a través de lavaloración potenciométrica y la determinación de alcalinidad.⁽⁴⁷⁾

La alcalinidad total es la capacidad del agua para neutralizar ácidos, debido a la presencia de sustancias como bicarbonato, carbonato e hidróxido, amoníaco, borato, fosfato, silicato y los aniones orgánicos que también pueden incluirse. Es aproximadamente equivalente a la concentración del anión bicarbonato para sustratos que tengan baja la concentración de AGV. Sin embargo, cuando la concentración de AGV se incrementa, estos son neutralizados por la alcalinidad al bicarbonato, y la alcalinidad total está compuesta por ambas, o sea, al bicarbonato y a los AGV. La muestra se valora con una solución de ácido normalizada hasta $\text{pH}=5$ y $\text{pH}=4,4$, de acuerdo con el método del Centro Federal Alemán de Investigación Agrícola (FAL), y para $\text{pH}=5$, $\text{pH}=4,3$, y $\text{pH}=4,0$, de acuerdo con Kapp.⁽⁴⁷⁾ Estos puntos finales se utilizan en la determinación de la alcalinidad parcial (AP), debida a los bicarbonatos y la intermedia (AI), que indica la concentración de AGV.

Determinación de productos de degradación de azúcares

La FL también puede contener productos de degradación de carbohidratos, como HMF y furfural, así como otros componentes de interés, como ácidos orgánicos y alcoholes de azúcar. Los azúcares monoméricos se cuantifican mediante HPLC con detector de índice de refracción, así como los azúcares oligoméricos (después de convertirse a la forma monomérica mediante hidrólisis ácida) y sus productos de degradación.⁽³⁸⁾

Producto de la degradación de pentosas y hexosas que conforman los azúcares, se forma el furfural y el HMF, que afectan negativamente los procesos de digestión anaerobia. Existen varios métodos para la determinación de ambos componentes: cromatografía de gases, HPLC y espectrofotometría. El más utilizado y más exacto es el de HPLC ^(7, 54), pero la espectrofotometría constituye un método más sencillo, que conlleva equipos más simples y es mucho más rápido (tabla 4), y ha mostrado tener resultados comparables al HPLC-UV en cuanto a selectividad, linealidad y exactitud en el análisis realizado en sirope de maíz, realizado por De Andrade y colaboradores.⁽⁵⁵⁾

Tabla 4- Diferentes condiciones empleadas en métodos espectrofotométricos para la cuantificación de furfural e HMF

Compuesto	Muestra	Condiciones de reacción	Longitud de onda (nm)	Referencia
Furfural HMF	Junco	Hidrólisis en solución etanol-agua (50 %) a 185°C y posterior destilación	276,78 284,28	/56/
HMF	Sirope de maíz	Con hidrogenosulfito de sodio al 0,1 % (p/v)	285	/55/

Determinación de productos de solubilización de la lignina

Debido a la solubilización de la lignina durante los pretratamientos, pueden formarse derivados fenólicos, entre ellos los ácidos ferúlico (ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenoico), p-cumárico (ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico), sirínquico (ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico), vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico) y gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) ⁽¹⁹⁾, que tienen efectos inhibitorios sobre procesos de bioconversión, como la digestión anaerobia, por lo que deben ser cuantificados. El método más utilizado con este fin en la evaluación de los pretratamientos a biomásas lignocelulósicas es el de HPLC ⁽¹⁹⁾,

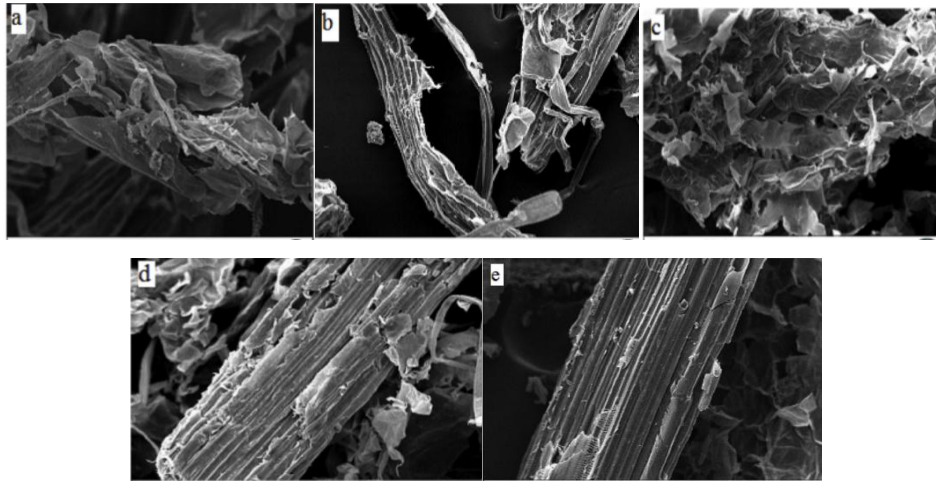
aunque existen otros métodos más convencionales que resultan confiables y pueden utilizarse, como el de Folin-Cicolteu ^(57, 58), basado en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Cicolteu (ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo) en medio básico, para originar, por reducción, una mezcla de óxidos de color azul, cuya absorbancia se mide a 765 nm.

Determinación cualitativa de cambios estructurales en la biomasa lignocelulósica

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

Actualmente, la SEM, TEM y AFM, son ampliamente utilizadas para investigar las estructuras de materiales lignocelulósicos a escalas nanométricas que no se pueden deducir por otros análisis (figura 3). Con ellas se pueden observar las microfibrillas y las paredes celulares. SEM y TEM pueden proporcionar imágenes bidimensionales, mientras que una alta resolución con imágenes tridimensionales puede ser obtenida por AFM sin la necesidad de preparar la muestra, teñirla, deshidratarla o cubrirla con algún metal para poner de relieve las estructuras de la pared celular y sus componentes.⁽⁵⁹⁾

Otro factor importante es la cristalinidad de la celulosa. A diferencia del almidón y la hemicelulosa, esta tiene una estructura que desempeña una función importante en la conversión biológica. Una evidencia de esto es la muy baja digestibilidad enzimática y microbiana de las fibras de algodón natural puro, en las que no está presente lignina ni hemicelulosa. La celulosa está formada en regiones con un orden molecular bajo (regiones amorfas o celulosa), regiones con un orden cristalino muy alto (celulosa cristalina), y una pequeña cantidad de la materia con un orden intermedio. Las regiones amorfas son capaces de adsorber el agua; además, su hidrólisis química, enzimática, y microbiana son más fáciles y más rápidas que para las zonas cristalinas. La celulosa amorfa se puede obtener de la celulosa cristalina por medio de los pretratamientos; sin embargo, en presencia de agua, la celulosa amorfa construida es termodinámicamente inestable y regresa en parte a su forma cristalina.⁽⁶⁾



Fuente: Nosratpour y colaboradores ⁽³⁹⁾

Fig. 3- Imágenes SEM ($\times 500$) de (a) Pretratamiento con carbonato de sodio a 180 °C, (b) Pretratamiento con carbonato de sodio a 140 °C, (c) Pretratamiento con sulfito de sodio a 140 °C, (d) Pretratamiento con acetato de sodio a 180 °C, y (e) Bagazo sin pretratar

Se ha informado en varias ocasiones que la “reducción de la cristalinidad” de la celulosa resulta en mayores velocidades de bioconversión.⁽⁵⁹⁾ Sin embargo, diversas investigaciones han demostrado que una mayor digestibilidad se puede obtener con mayor cristalinidad. En esos casos, otros factores (área superficial accesible, porosidad, contenido de lignina y hemicelulosa, y tamaño de partícula) fueron los de mayor influencia. La cristalinidad puede ser analizada por XRD, FTIR y RMN. FTIR es un método adecuado para propósitos comparativos, mientras que los valores del índice de cristalinidad son más precisos por los análisis de XRD y de RMN.⁽⁶⁾

Conclusiones

A partir del análisis de las técnicas empleadas en la evaluación del efecto de los pretratamientos, se concluye que: los métodos de análisis de carbohidratos estructurales y lignina de Weender y Van Soest continúan siendo utilizados para el análisis de biomásas lignocelulósicas pretratadas, pero se deben tener en cuenta varios aspectos para realizar los procedimientos; los métodos cromatográficos permiten identificar los monosacáridos presentes en la fracción líquida, pero los métodos colorimétricos como los de Dubois y Miller permiten un análisis simple y más rápido de las muestras; la potenciometría resulta una vía alternativa al HPLC muy atractiva para la determinación de AGV en muestras pretratadas; y es importante tener en cuenta que no solo basta con conocer la variación en la composición y

eliminación de los componentes con el pretratamiento, también es necesario conocer su relocalización y cómo cambia su interacción con los demás componentes, a partir del empleo de técnicas como la microscopía electrónica de barrido y la microscopía de fuerza atómica.

Listado de abreviaturas

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
ST	sólidos totales	HPLC	cromatografía líquida de alta eficiencia
SV	sólidos volátiles	HMF	5-hidroximetilfurfural
AGV	ácidos grasos volátiles	DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
FS	fracción sólida	DQO	demanda química de oxígeno
FL	fracción líquida	DQOs	demanda química de oxígeno soluble
FC	fibra cruda	SEM	microscopía electrónica de barrido
FDN	fibra detergente neutro	TEM	microscopía electrónica de transmisión
FDA	fibra detergente ácida	AFM	microscopía de fuerza atómica
AIL	lignina insoluble en ácido	XRD	difracción de rayos X
ASL	lignina soluble en ácido	RMN	resonancia magnética nuclear
CG	cromatografía de gases	FTIR	espectroscopía infrarroja a transformada de Fourier

Referencias bibliográficas

1. WOICIECHOWSKI, A. L. y otros. “Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance—conventional processing and recent advances”. *Bioresource Technology*. 2020, **304**, 1-9. DOI: <https://doi.org/10.2016/j.biortech.2020.122848>.
2. GALBE, M. , WALLBERG, O. “Pretreatment for biorefineries: a review of common methods for efficient utilisation of lignocellulosic materials”. *Biotechnology for Biofuels*. 2019, **12** (1), 294-320. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1634-1>.
3. BHATIA, S. K. y otros. “Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: effect of key parameters, technological improvements, and challenges”. *Bioresource Technology*. 2020, **300**, 1-13. DOI: <https://doi.org/10.2016/j.biortech.2019.122724>.

4. YOO, C. G. y otros. "The critical role of lignin in lignocellulosic biomass conversion and recent pretreatment strategies: a comprehensive review". *Bioresource Technology*. 2020, **301**, 1-10. DOI: <https://doi.org/10.2016/j.biortech.2020.122784>.
5. ABRAHAM, A. y otros. "Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass". *Bioresource Technology*. 2020, **301**, 1-13. DOI: <https://doi.org/10.2016/j.biortech.2019.122725>.
6. KARIMI, K.; TAHERZADEH, M. J. "A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: composition, imaging, and crystallinity". *Bioresource technology*. 2016, **200**, 1008-1018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.022>.
7. JANKE, L. y otros. "Pre-treatment of filter cake for anaerobic digestion in sugarcane biorefineries: Assessment of batch versus semi-continuous experiments". *Renewable Energy*. 2019, **143**, 1416-1426. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.05.029>.
8. DU, J. y otros. "Hydrothermal and alkaline thermal pretreatment at mild temperature in solid state for physicochemical properties and biogas production from anaerobic digestion of rice straw". *Renewable energy*. 2019, **139**, 261-267. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.01.097>.
9. LABORATORY., N. R. E. Biomass Compositional Analysis Laboratory Procedures [en línea] [Fecha de consulta: 7 mayo 2021]. Disponible en: www.nrel.gov/bioenergy/biomass-compositional-analysis.html.
10. SLUITER, J.; SLUITER, A., *Summative mass closure*. Laboratory Analytical Procedure (LAP): 2010. NREL, NREL/TP-510-48087. Disponible en: www.nrel.gov/docs/gen/fy11/48087.pdf.
11. ORHORHORO, E. y otros. "Experimental Determination of Effect of Total Solid (TS) and Volatile Solid (VS) on Biogas Yield". *American Journal of Modern Energy*. 2017, **3** (6), 131-135. DOI: <https://doi.org/10.11648/j.ajme.20170306.13>.
12. RICE, E. W.; BAIRD, R. B.; EATON, A. D. "2540 Solids (2017)". En: (Eds). "Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater". *American Public Health Association*, 2018. ISBN: 0-87553-235-7. Disponible en: <https://www.standardmethods.org/doi/book/10.2105/smww.2882>.
13. WEINRICH, S. Value of Batch Tests for Biogas Potential Analysis: Method Comparison and Challenges of Substrate and Efficiency Evaluation of Biogas Plants. Irlanda: *IEA Bioenergy*, 2018. ISBN: 978-1-910154-49-6. Disponible en: <https://www.ieabioenergy.com/blog/publications/value-of-batch-tests-for-biogas-potential->

analysis-method-comparison-and-challenges-of-substrate-and-efficiency-evaluation-of-biogas-plants.

14. WEISSBACH, F.; STRUBELT, C. “Correcting the dry matter content of sugar beet silages as a substrate for biogas production”. *Landtechnik*. 2008, **63** (6), 354-355. Disponible en: <http://landtechnik-net.com>.
15. ANGELIDAKI, I. y otros. “Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays”. *Water science and technology*. 2009, **59** (5), 927-934. DOI: <https://doi.org/10.2166/wst.2009.040>.
16. SLUITER, A. y otros., Determination of ash in biomass laboratory analytical procedure. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*: 2005. NREL, NREL/TP-510-42622. Disponible en: www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42622.pdf.
17. SLUITER, A. y otros. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, in: *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*: 2008. NREL, NREL/TP-510-42618. Disponible en: www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42618.pdf.
18. RICE, E. W.; BAIRD, R. B.; EATON, A. D. “6200 VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS (2017)”. En: (Eds). *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, 2018. Disponible en: <https://www.standardmethods.org/doi/book/10.2105/smww.2882>.
19. LÓPEZ GONZÁLEZ, L. M. y otros. “Effect of liquid hot water pre-treatment on sugarcane press mud methane yield”. *Bioresource Technology*. 2014, **169**, 284-290. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.107>.
20. RODRÍGUES, C. I. S.; JACKSON, J. J.; MONTROSS, M. D. “A molar basis comparison of calcium hydroxide, sodium hydroxide, and potassium hydroxide on the pretreatment of switchgrass and miscanthus under high solids conditions”. *Industrial Crops and Products*. 2016, **92**, 165-173. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.010>.
21. HAMES, B. R. “Biomass compositional analysis for energy applications”. En: Mielenz, J. R. (Eds). *Methods in Molecular Biology*. Springer, 2009, vol. 581, pp. 145-167. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-214-8_11.
22. OKWUNODULU, F.; ONUCHI, M.; NWACHUKWU, M. N. “Comparative studies on the proximate and phytochemical analysis of talinum triangulare as a function of drying techniques”. *Journal Of Chemical Society Of Nigeria*. 2020, **45** (2), 193-198. Disponible en: <https://journals.chemsociety.org.ng/index.php/jcsn/article/view/446/507>.

23. JAIMES, L. J.; GIRALDO, A. M.; CORREA, H. J. “De Parmentier a Van Soest y más allá: un análisis histórico del concepto y métodos de determinación de la fibra en alimentos para rumiantes”. *Livestock Research for Rural Development*. 2018, **30** (7), 1-9. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd30/7/hjco30126.html>.
24. PARADA, S. y otros. “Nutritional value of *Dasyphyllum diacanthoides* (Less.) Carb.: an endemic tree used as supplementary forage in agroforestry systems”. *Bioagro*. 2020, **32** (2), 139-144. Disponible en: <https://revistas.uclave.org/index.php/bioagro/article/view/2698>.
25. CASTILLO RODRÍGUEZ, S. P. y otros. “Análisis proximal y digestibilidad in vitro de la morera (*morus nigra*).”. *Transversalidad científica y tecnológica*. 2020, **4** (1), 1-5. Disponible en: www.atictac.org.mx/revista.html.
26. MALUSHI, N. y otros. “Determination of chemical content and dry matter digestibility of some under- utilized feeds in ruminants feeding through two in vitro methods.”. *Scientific Papers. Series D. Animal Science*. 2017, **60**, 91-96. Disponible en: <http://animalsciencejournal.usamv.ro/index.php/scientific-papers/428-determination-of-chemical-content-and-dry-matter-digestibility-of-some-under-utilized-feeds-in-ruminants-feeding-through-two-in-vitro-methods-694>.
27. SHEN, J. y otros. “Co-pretreatment of wheat straw by potassium hydroxide and calcium hydroxide: Methane production, economics, and energy potential analysis”. *Journal of environmental management*. 2019, **236**, 720-726. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.01.046>.
28. ZHOU, J. y otros. “Effect of steam explosion pretreatment on the anaerobic digestion of rice straw”. *RSC advances*. 2016, **6** (91), 88417-88425. DOI: <https://doi.org/10.1039/c6ra15330e>.
29. VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. “Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition”. *Journal of Dairy Science*. 1991, **74** (10), 3583-3597. ISSN: 0022-0302. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
30. JANKE, L. y otros. “Improving anaerobic digestion of sugarcane straw for methane production: Combined benefits of mechanical and sodium hydroxide pretreatment for process designing”. *Energy Conversion and Management*. 2017, **141**, 378-389. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2016.09.083>.
31. JANKE, L. y otros. “Comparison of start-up strategies and process performance during semi-continuous anaerobic digestion of sugarcane filter cake co-digested with bagasse”.

- Waste Management*. 2016, **48**, 199-208. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2015.11.007>.
32. YOU, Z. y otros. "Effects of corn stover pretreated with NaOH and CaO on anaerobic co-digestion of swine manure and corn stover". *Applied Sciences*. 2019, **9** (1), 123-134. DOI: <https://doi.org/10.3390/app9010123>.
33. MOKOMELE, T. y otros. "Incorporating anaerobic co-digestion of steam exploded or ammonia fiber expansion pretreated sugarcane residues with manure into a sugarcane-based bioenergy-livestock nexus". *Bioresource technology*. 2019, **272**, 326-336. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.049>
34. DAHUNSI, S. O. "Mechanical pretreatment of lignocelluloses for enhanced biogas production: Methane yield prediction from biomass structural components". *Bioresource technology*. 2019, **280**, 18-26. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.006>.
35. HAMES, B.; SCARLATA, C.; SLUITER, A. "Determination of protein content in biomass". *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*: 2008. NREL, NREL/TP-510-42625. Disponible en: www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42625.pdf.
36. RICE, E. W.; BAIRD, R. B.; EATON, A. D. "4500-N Nitrogen (2017)". En: (Eds). *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, 2018. ISBN: 0-87553-235-7. Disponible en: <https://www.standardmethods.org/doi/book/10.2105/smww.2882>.
37. DEAN GOLDRING, J. P. "Measuring Protein Concentration with Absorbance, Lowry, Bradford Coomassie Blue, or the Smith Bicinchoninic Acid Assay Before Electrophoresis". En: Kurien, B. T., y Scofield, R. H. (Eds). *Electrophoretic Separation of Proteins: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York, 2019, vol.1855, pp. 31-39. ISBN: 978-1-4939-8793-1. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_3.
38. SLUITER, A. y otros. "Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples". *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*: 2006. NREL, NREL/TP-510-42623. Disponible en: www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42623.pdf.
39. NOSRATPOUR, M. J.; KARIMI, K.; SADEGHI, M. "Improvement of ethanol and biogas production from sugarcane bagasse using sodium alkaline pretreatments". *Journal of environmental management*. 2018, **226**, 329-339. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.058>.

40. AVILA NÚÑEZ, R. y otros. "Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease". *Multiciencias*. 2012, **12** (2), 129-135. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90424216002>.
41. LÓPEZ-LEGARDA, X. y otros. "Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales". *Revista Cubana de Química*. 2017, **29** (2), 180-198. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttex&pid=S2224-54212017000200002.
42. BURGOS MONTAÑEZ, L. J. "Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico". *Questionar: Investigación Específica*. 2020, **7** (1), 57-66. DOI: <https://doi.org/10.29097/23461098.308>.
43. SLUITER, A. y otros. "Determination of extractives in biomass". Laboratory Analytical Procedure (LAP): 2005. NREL, NREL/TP-510-42619. Disponible en: www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42619.pdf.
44. BURKHARDT, S. y otros. "How effective are traditional methods of compositional analysis in providing an accurate material balance for a range of softwood derived residues?". *Biotechnology for biofuels*. 2013, **6** (90), 1-10. Disponible en: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/6/1/90>.
45. MOORE, S. A. y otros. "Effects of alpha-amylase reaction mechanisms on analysis of resistant-starch contents". *Carbohydrate polymers*. 2015, **115**, 465-471. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.014>.
46. RICE, E. W.; BAIRD, R. B.; EATON, A. D. "5220 Chemical Oxygen Demand (COD) (2017)". En: (Eds). *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association*, 2018. Disponible en: <https://www.standardmethods.org/doi/book/10.2105/smww.2882>.
47. LIEBETRAU, J.; PFEIFFER, D.; THRÄN, D. "Collection of Methods for Biogas: Methods to determine parameters for analysis purposes and parameters that describe processes in the biogas sector". *Biomass Energy Use*. 2016, **7**, 1-107. Disponible en: <https://energetische-biomassenutzung.de/en/publications/series-biomass-energy-use/07-collection-of-measurement-methods-for-biogas-2>.
48. GARROTE, G.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. "Hydrothermal processing of lignocellulosic materials". *Holz als Roh-und Werkstoff*. 1999, **57** (3), 191-202. DOI: <https://doi.org/10.1007/s001070050039>.

49. JANKE, L. y otros. "Optimization of hydrolysis and volatile fatty acids production from sugarcane filter cake: Effects of urea supplementation and sodium hydroxide pretreatment". *Bioresource Technology*. 2016, **199**, 235-244. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.117>.
50. LÓPEZ GONZÁLEZ, L. M. "Análisis de alternativas de Producción Más Limpias (PML) para la producción de biogás con fines energéticos en una empresa azucarera diversificada", in Departamento de Ingeniería Química. Tesis de Doctorado. Universidad Central "Marta Abreu de Las Villas", Santa Clara, Cuba, 2016. Disponible en: <https://books.google.com.cu/books?id=WjK0tAEACAAJ>.
51. XIN, L. y otros. "Feasibility of anaerobic digestion on the release of biogas and heavy metals from rice straw pretreated with sodium hydroxide". *Environmental Science and Pollution Research*. 2019, **26** (19), 19434-19444. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05195-x>.
52. GUAN, R. y otros. "Enhancing anaerobic digestion performance and degradation of lignocellulosic components of rice straw by combined biological and chemical pretreatment". *Science of the Total Environment*. 2018, **637**, 9-17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.366>.
53. CHATTERJEE, B.; RADHAKRISHNAN, L.; MAZUMDER, D. "New approach for determination of volatile fatty acid in anaerobic digester sample". *Environmental Engineering Science*. 2018, **35** (4), 333-351. DOI: <https://doi.org/10.1089/ees.2017.0190>.
54. HUAMÁN CASTILLA, N. y otros. "Uso de edulcorantes comerciales como una alternativa a la reducción de 5-Hidroximetil-2- Furfural (HMF) en galletas modelo". *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2017, **83** (2), 213-220. DOI: <https://doi.org/10.37761/rsqp.v83i2.199>.
55. DE ANDRADE, J. K. y otros. "A validated fast difference spectrophotometric method for 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) determination in corn syrups". *Food chemistry*. 2017, **228**, 197-203. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.158>.
56. ZHANG, H. y otros. "Determination of Furfural and Hydroxymethyl furfural by UV Spectroscopy in ethanol-water hydrolysate of Reed". *Journal of Bioresources and Bioproducts*. 2017, **2** (4), 170-174. DOI: <https://doi.org/10.21967/jbb.v2i4.84>.
57. HERNÁNDEZ GÓMEZ, D. *Contenido en polifenoles de subproductos agrícolas y agroindustriales de la Vega Baja del Segura*. 2019, Universidad Miguel Hernández de Elche: España. Disponible en: <http://dspace.umh.es/handle/11000/5379>.

58. NOSSA GONZÁLEZ, D. L. y otros. “Determinación del contenido de polifenoles y actividad antioxidante de los extractos polares de comfrey (*Symphytum officinale* L)”. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2016, **21** (2), 125-132. Disponible: <https://revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/296>

59. OSTOVAREH, S.; KARIMI, K.; ZAMANI, A. “Efficient conversion of sweet sorghum stalks to biogas and ethanol using organosolv pretreatment”. *Industrial Crops and Products*. 2015, **66**, 170-177. DOI://doi.org/10.2016/j.indcrop.2014.12.023.

Conflicto de interés

Los autores expresan que no hay conflictos de intereses en el manuscrito presentado.

Contribuciones de los autores

Ana María Espinosa Negrín. Realizó la revisión bibliográfica, escritura del artículo y revisión de la versión final del trabajo.

Lisbet Mailín López González. Realizó la orientación científica y metodológica, participó en la discusión de los resultados y en la aprobación final del trabajo.

Neibys Lourdes Casdelo Gutiérrez. Participó en la discusión de resultados y en la revisión final del trabajo.