



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

# **EVALUACIÓN DE PRETRATAMIENTO CON LÍQUIDOS IÓNICOS PRÓTICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO**

**TRINIDAD DE LA LUZ CORTÉS SORDO**

**PROFESORA GUÍA:**

**MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS**

**MIEMBROS DE LA COMISIÓN:**

**ORIANA SALAZAR AGUIRRE**

**ZIOMARA GERDTZEN HAKIN**

**SANTIAGO DE CHILE**

**ABRIL 2013**

## Resumen

Debido al agotamiento de las reservas de combustibles fósiles y la creciente demanda de consumo, al cambio climático producido por los gases de efecto invernadero y al cada vez mayor interés de los países de independizarse energéticamente, es que surge la motivación para el estudio de nuevas fuentes de energías no convencionales, como los biocombustibles. Por su parte, el bioetanol de segunda generación proviene de biomasa lignocelulósica, donde las fibras de celulosa están contenidas en una matriz de lignina y de hemicelulosa, lo que requiere de un pretratamiento que permita el acceso de las enzimas al material. Este trabajo se basó en el pretratamiento con Líquidos iónicos (LI), que son sales que se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente y que están compuestos únicamente por iones. Los PILs (líquidos iónicos próticos) se diferencian de los AILs (líquidos iónicos apróticos) en que los primeros presentan un protón disponible para realizar el mecanismo de acción y disolver la celulosa.

El objetivo general de este trabajo es evaluar el proceso de producción de bioetanol de segunda generación pretratada con Líquidos iónicos próticos (PILs). Como objetivos específicos, se evaluó el efecto del tiempo de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) que permita mejorar el proceso de producción de bioetanol. Además, se evaluó rendimiento del pretratamiento con PIL en distintas condiciones y se hizo una comparación entre rendimiento del pretratamiento con PILs respecto al pretratamiento con AILs. El trabajo pretende establecer parámetros de operación en el proceso de producción de bioetanol que puedan ser una guía para la producción industrial.

Para esto, se evaluaron diferentes tiempos (1, 3 y 5h), temperaturas (70 y 110°C) y razón biomasa/LI (1/3, 1/6, 1/10) en el pretratamiento, además del tiempo de SSF (24, 48 y 72 h). Se utilizó el PIL 2 - HEAA, como control positivo el AIL [EMIM] [Ac] y se utilizó como control negativo material sin pretratamiento.

Al evaluar el pretratamiento con 2 - HEAA, se determinó que las condiciones que logran la mayor producción de etanol tanto en el pretratamiento como en SSF, son: 1 hora de pretratamiento, 110 °C de temperatura, razón biomasa/LI de 1/3 y luego de 24 horas de SSF. Para la determinación de estas condiciones se estableció la productividad de etanol por hora de pretratamiento ( $\text{g EtOH/h}_{\text{pretratamiento}}$ ) y por hora de SSF ( $\text{g EtOH/h}_{\text{SSF}}$ ), y a la cantidad de LI utilizado ( $\text{g EtOH/g LI}$ ). En las condiciones antes mencionadas, las productividades más altas fueron:  $0,0012 \text{ g EtOH/h}_{\text{SSF}}$ ,  $0,015 \text{ g EtOH/h}_{\text{pretratamiento}}$  y  $0,0043 \text{ g EtOH/g LI}$ .

Además, se pudo demostrar que comparativamente, el pretratamiento con líquido iónico aprótico [EMIM] [Ac] es muy superior al líquido iónico prótico 2-HEAA, produciendo hasta un 382% más etanol que lo generado pretratando con PIL. Este último produce 10% de rendimiento porcentual en la SSF, en el mejor de los casos, en comparación al 50% obtenido por el pretratamiento con [EMIM] [Ac].

Se puede concluir que el comportamiento del 2 - HEAA aún dista mucho de lo obtenido por el [EMIM] [Ac] y es insuficiente para ser aplicado en el proceso productivo de bioetanol. Sin embargo, puede ser útil hacer un estudio similar con otro PIL o realizar un estudio de factibilidad económica con los datos entregados en este trabajo, de modo de determinar si pueden disminuir los costos de producción al ser este PIL más económico.

En memoria de  
Humberto Cortés Jara,  
Olga Luco Bohorquez,  
María Isabel Cortés Luco,  
Christian Lavegne Vergara,  
y Alejandro Salas Valenzuela.

## Agradecimientos

Al estar en el fin de mi carrera Universitaria, quiero agradecer a todos quienes han estado presentes, de una u otra manera, en el desarrollo de esta bonita etapa.

Agradecer a mis Padres, Jaime y Maricarmen, por enseñarme a ser responsable y ordenada, y por darme la oportunidad y la confianza para venir a estudiar a Santiago. Gracias a mis hermanas Monse, Maly y Maricarmen por tener fe en mi y empujarme a trabajar cuando ya las energías no me daban. A toda mi familia, por el amor, la paciencia, el apoyo incondicional y el soporte emocional aún estando lejos, han sido fundamentales para llegar hasta acá. Los amo.

Quiero agradecer también a la familia que tengo en Santiago: mis amigos. A Pablo, Nubian, Larguito, Kari, Sele, Kiki, Cami, Naty, Felipe, Stivo, Prepago, Loco, Pan, Marito, Bas, Chino, Estrella, Coqueto, Serena y Negro. Han sido para mí una compañía segura, una palabra de aliento, la ayuda necesaria y la alegría de ir a la U. Gracias de todo corazón. A los IQBTitos, Becky, Carlitos, Naty buena, Javi y Lis, por su amistad y por su infinita paciencia con mis preguntas, por ayudarme a pasar reactores, por los momentos de café y galletitas, por siempre apoyarme y creer en mí. A Javier y Gonzalo, por su buena onda, ayuda y compañía en el laboratorio. A Ivancito, porque cuando nos vinimos a Santiago, pasaste a ser un hermano para mí, un pedacito de Temuco más cerca que me hace muy feliz. A los amigos de siempre, María, Carla, Camila, Dani, Sergito y Priscilla, porque a pesar de que nos vemos poco, son una constante en mi vida que me ayuda a mantener el rumbo y no olvidarme de donde vengo. Los adoro. Y gracias a la Valefi, porque has hecho este último tiempo muchísimo más feliz.

Muchas gracias a Gonzalo, mi gordito, por estar siempre conmigo, por darme el coraje para enfrentar el mundo, porque juntos hemos aprendido muchas cosas, por cuidarme, acompañarme, regalarme y aconsejarme cuando lo necesité. Quizás no ha sido fácil, pero ha sido hermoso y feliz. Te amo.

Gracias a David Bustos y toda su familia, por apoyarme y acogerme en los primeros pasos de esta larga carrera. Y a la familia Ilabaca Yañez por recibirme cariñosamente como una más.

Agradecer al Departamento de Investigación VID de la Universidad de Chile por el apoyo Vía el proyecto U-Apoya Enlace (ENL-1/12), quienes hicieron posible el desarrollo de este trabajo. Al departamento de Ingeniería Química y Biotecnología, profesores y funcionarios, especialmente a mi profesora guía, María Elena Lienqueo por su paciencia y ayuda siempre que lo requerí; y a Gina por estar disponible cuando necesité algo, desde una tijera a una solicitud de inscripción académica. Por la disposición, la buena voluntad, el cariño y la alegría, muchas gracias. Y gracias a los chicos del CIBYB por su paciencia y su ayuda, especialmente a Dani S, que se la jugó por mi trabajo, a Rodrigo, que me enseñó lo necesario para poder comenzar, y a Fabián y Allison, por la buena onda, las conversaciones y las risas.

Y gracias a Dios, por poner a toda esta gente maravillosa en mi camino.

## Tabla de contenido

I.	Introducción.....	1
I.1.	Motivación.....	1
I.1.i.	Agotamiento del petróleo y crisis energética.....	1
I.1.ii.	Problema medioambiental.....	2
I.1.iii.	Dependencia de combustibles fósiles en Chile.....	3
I.2.	Marco teórico.....	4
I.2.i.	Biocombustibles y bioetanol.....	4
I.2.ii.	Biomasa lignocelulósica.....	6
I.2.iii.	Proceso de producción de bioetanol.....	7
I.2.iv.	Líquidos iónicos.....	10
I.3.	Antecedentes.....	13
I.3.i.	Pretratamiento con PIL.....	13
I.3.ii.	Sacarificación y fermentación simultánea.....	15
I.4.	Objetivos.....	17
I.4.i.	Objetivo General.....	17
I.4.ii.	Objetivos Específicos.....	17
II.	Materiales, procedimientos y metodología.....	18
II.1.	Materiales.....	18
II.1.i.	Madera.....	18
II.1.ii.	Líquidos iónicos.....	18
II.1.iii.	Enzimas.....	18
II.1.iv.	Microorganismo fermentador.....	18
II.2.	Procedimientos.....	19
II.2.i.	Pretratamiento.....	19
II.2.ii.	Lavado del material pretratado.....	19
II.2.iii.	Secado del material pretratado.....	20
II.2.iv.	Sacarificación y fermentación simultáneas.....	21
II.3.	Metodologías.....	22
II.3.i.	Medición de azúcares reductores.....	22
II.3.ii.	Medición de glucosa.....	22
II.3.iii.	Medición de etanol.....	22

III.	Resultados y discusión.....	23
III.1.	Estudio del efecto del Tiempo de SSF .....	24
III.2.	Efecto de la Temperatura de pretratamiento .....	29
III.3.	Efecto del tiempo y de la razón biomasa/LI en el pretratamiento. ....	30
III.4.	Comparación entre los pretratamientos con PIL y AIL .....	38
III.5.	Discusión general .....	40
IV.	Conclusiones .....	41
	Recomendaciones .....	43
	Referencias .....	44
	Anexos .....	44
A.	Composición porcentual de biomasa.....	44
B.	Estructuras Lignocelulósicas .....	45
C.	Mecanismo de hidrólisis enzimática .....	47
D.	Mejores resultados para cada condición.....	48
E.	Resultados generales .....	49
F.	Memoria de cálculo.....	55
F.a.	Cálculo del etanol potencial.....	55
F.b.	Cálculo del rendimiento y parámetros utilizados .....	56
F.b.1.	Rendimiento porcentual .....	56
F.b.2.	Rendimiento [l EtOH/ton material pretratado] .....	56
F.b.3.	Productividad [g EtOH/h <sub>SSF</sub> ] .....	56
F.b.4.	Productividad [g EtOH/h <sub>pretratamiento</sub> ] .....	57
F.b.5.	Productividad [g EtOH/g LI] .....	57
F.b.6.	Diferencias porcentuales .....	57
G.	Imágenes.....	58

## Índice de tablas

Tabla I-1: Tipos de pretratamiento, ventajas y desventajas <sup>[21,22]</sup> .....	8
Tabla I-2: Rendimientos obtenidos en distintas condiciones de SSF <sup>[21]</sup> .....	16
Tabla III-1: Parámetros en estudio y rangos de trabajo para el pre-tratamiento y SSF. Agentes de pretratamiento utilizados. ....	23
Tabla III-2: Diferencias porcentuales entre las concentraciones obtenidas con el material sin pretratamiento y material pretratado con PIL a 110 °C en cada tiempo de pretratamiento y para cada razón biomasa/LI. ....	32
Tabla III-3: Valores máximos obtenidos para el rendimiento g EtOH/h <sub>pretratamiento</sub> y su correspondiente concentración de etanol y tiempo de pretratamiento. ....	36
Tabla III-4: Mejores valores de productividad por gramo de LI para cada tipo de LI estudiado y las condiciones de operación correspondientes, para material pretratado a 110 °C de temperatura y 24 horas de SSF. ....	39
Tabla A-1: Composición de la distintos tipos de biomasa (Adaptación L. Cuervo <sup>[22]</sup> ). ....	44
Tabla A-2: Composición química del residuo de Eucalipto (Adaptación L. Martínez <sup>[21]</sup> ). ....	44
Tabla D-1: Valores máximos de los resultados obtenidos en cada experimento, tanto para la concentración de etanol obtenido como para los rendimientos calculados. HEAA corresponde a los resultados del pretratamiento con PIL. C+ corresponde al material pretratado con [EMIM] [Ac]. C- corresponde a material sin pretratamiento. ....	48
Tabla E-1: Resultados de la SSF para material pretratado a 110 °C con razón biomasa/LI de 1/10. ....	49
Tabla E-2: Resultados de la SSF para material pretratado a 110 °C con razón biomasa/LI de 1/6. ....	50
Tabla E-3: Resultados de la SSF para material pretratado a 110 °C con razón biomasa/LI de 1/3. ....	51
Tabla E-4: Resultados de la SSF para material pretratado a 70 °C con razón biomasa/LI de 1/10. ....	52
Tabla E-5: Resultados de la SSF para material pretratado a 70 °C con razón biomasa/LI de 1/6. ....	53
Tabla E-6: Resultados de la SSF para material pretratado a 70 °C con razón biomasa/LI de 1/3. ....	54

## Índice de ilustraciones

Figura I-1: Demanda mundial de petróleo en miles de barriles por día (Fuente: Adaptación Agencia Internacional de Energía, IEA <sup>[2]</sup> ).....	1
Figura I-2: Producción mundial de petróleo en gigabarriles por año (Fuente: Adaptación ASPO <sup>[4]</sup> ).....	2
Figura I-3: Proyección de emisiones sin medidas de mitigación (Baseline) y con medidas de mitigación (BLUE Map) (Fuente: Adaptación IEA, Energy Technology Perspective, 2011 <sup>[7]</sup> ).....	3
Figura I-4: Distribución de la matriz energética en Chile al año 2012(Fuente: Gobierno de Chile <sup>[8]</sup> ) .....	3
Figura I-5: Países productores de etanol y su participación en el mercado (Fuente: Adaptación CEPAL <sup>[18]</sup> ).....	5
Figura I-6: Esquema de la matriz lignocelulósica <sup>[21]</sup> .....	6
Figura I-7: Esquema de biomasa antes y después del pre tratamiento (Fuente: Adaptación Heat Exchangers <sup>[23]</sup> ). .....	7
Figura I-8: Esquema de producción de bioetanol de segunda generación.....	7
Figura I-9: Mecanismo de acción de los Líquidos Iónicos <sup>[25]</sup> .....	11
Figura I-10: Aniones y cationes usados generalmente en la formación de AILs <sup>[30]</sup> .....	11
Figura I-11: Estructura del AIL [EMIM] [Ac] (arriba) y del PIL 2 – HEAA (abajo) <sup>[21, 37]</sup> .....	12
Figura I-12: Resultados de concentración de glucosa luego de la sacarificación para material pretratado con HEAA por 30 minutos (izquierda) y por 60 minutos (derecha) a 150 °C, 110 °C y 70 °C <sup>[39]</sup> .....	14
Figura I-13: Resultados de concentración de glucosa luego de la sacarificación con material pretratado con HEAA por 90 minutos a 185 °C <sup>[39]</sup> .....	15
Figura II-1: Pretratamiento. Derecha: montaje del pretratamiento en el baño termoregulado. Izquierda: viales luego del pretratamiento con PIL y control negativo, respectivamente. ....	19
Figura II-2: Muestras después de cada lavado. Los tubos 1 y 2 de cada imagen corresponden a material pretratado con PIL, el tubo 3 a material pretratado con AIL y el tubo 4 corresponde a material sin pretratamiento. Las imágenes corresponden al primer (a), segundo (b) y tercer (c) lavado, respectivamente. ....	20
Figura II-3: Material preparado para el secado. Pretratamiento con PIL (izquierda) y control negativo (derecha).....	20
Figura II-4: Montaje del sistema para la SSF. Los dos primeros matraces (M1 y M2) corresponden a material pretratado con PIL. El tercer matraz (C+) corresponde a material pretratado con PIL. El cuarto	

matraz (C-) corresponde a material sin pretratamiento, todos para 5 horas de pretratamiento (análoga configuración se utiliza para todas las condiciones de pretratamiento). .....	21
Figura III-1: Rendimiento porcentual respecto de lo potencial para cada razón biomasa/LI, en base a muestras de SSF con material pretratado a 110°C en las tres razones biomasa/LI y los tres tiempos de pretratamiento mencionados en la figura. ....	24
Figura III-2: Productividad por hora de SSF para cada razón biomasa/LI, en base a muestras de SSF con material pretratado a 110°C en las tres razones biomasa/LI y los tres tiempos de pretratamiento mencionados en la figura.....	26
Figura III-3: Concentraciones obtenidas por día de SSF para cada razón biomasa/LI, en base a muestras de SSF con material pretratado a 110°C en las tres razones biomasa/LI y los tres tiempos de pretratamiento mencionados en la figura. Barras de error indican la desviación estándar de cada muestra. ....	27
Figura III-4: Concentración de azúcares reductores y glucosa luego de cada día de SSF, en base a muestras de SSF con material pretratado a 110°C en las tres razones biomasa/LI y los tres tiempos de pretratamiento mencionados en la figura.....	28
Figura III-5: Máximas concentraciones (g/l) de etanol (barras, eje izquierdo) y rendimientos porcentuales (líneas, eje derecho) obtenidos para las distintas temperaturas de pretratamiento. Corresponden a máximos valores a partir de material pretratado a 1, 3 y 5 horas con PIL, no necesariamente en orden. El control negativo (C-) corresponde a las concentraciones de etanol obtenidas a partir de material sin pretratamiento. Barras de error indican la desviación estándar de cada muestra.....	29
Figura III-6: Concentración de etanol luego de 24 horas de SSF utilizando material pretratado a 110 °C en los tiempos y razones biomasa/LI correspondientes. La figura a. muestra la concentración para material pretratado con PIL. La figura b. muestra la concentración utilizando material si pretratar (control negativo).....	31
Figura III-7: Concentración de azúcares reductores y glucosa luego de 24 horas de SSF utilizando material pretratado con PIL en razón biomasa/LI de 1/10 durante los tres tiempos de pretratamiento mencionados en el gráfico. ....	33
Figura III-8: Rendimientos porcentuales de etanol luego de 24 horas de SSF utilizando material pretratado a 110 °C en los tiempos y razones biomasa/LI correspondientes. La figura a. muestra los rendimientos porcentuales para material pretratado con PIL. La figura b. muestra los rendimientos porcentuales utilizando material si pretratar (control negativo).....	34
Figura III-9: Productividad de etanol por hora de pretratamiento ( $g/h_{\text{pretratamiento}}$ ) obtenidos para material pretratado a 110°C por el tiempo y las razones biomasa/LI que se indican, y luego de 24 horas de SSF... ..	35
Figura III-10: Productividad de etanol por gramo de LI utilizado ( $g/g$ LI) obtenidos para material pretratado a 110°C por el tiempo y las razones biomasa/LI que se indican, y luego de 24 horas de SSF... ..	37
Figura III-11: Concentración (barras, eje izquierdo) y rendimiento porcentual (líneas, eje derecho) para EtOH en distintas razones biomasa/LI aplicadas en el pretratamiento, luego de 24 horas de SSF El control negativo (C-) corresponde a los resultados en la concentración de etanol aplicando material sin	

pretratamiento. El control positivo (C+) corresponde a los resultados en la concentración de etanol aplicando material pretratado con Líquido Iónico Aprótico (AIL) [EMIM] [Ac]. .....	38
Figura B-1: Estructura de la celulosa <sup>[24]</sup> . .....	45
Figura B-2: Estructura de las principales hexosas presentes en la hemicelulosa [24]. .....	45
Figura B-3: Estructura de las principales pentosas presentes en la hemicelulosa [24]. .....	45
Figura B-4: Estructura de los principales grupos aromáticos que componen la lignina [24]. .....	46
Figura B-5: Subestructuras de la lignina donde se muestran enlaces tipo éter $\beta - O - 4$ y formas condensadas.....	46
Figura C-1: Representación esquemática de la hidrólisis de la celulosa amorfa y cristalina en el sistema de celulasas complejo (A) y no complejo (B) <sup>[22]</sup> . .....	47
Figura G-1: Molino utilizado en trituración de eucaliptus. ....	58
Figura G-2:Material listo para ser agregado al medio. Primera y segunda columna de material pretratado con PIL, tercera columna control positivo y última columna control negativo. ....	58

## Nomenclatura y abreviaciones

IEA: Agencia Internacional de Energía (International Energy Agency).

ASPO: Asociación para el Estudio del Pico del Petróleo y del Gas (Association for the Study of Peak Oil and Gas).

PIB: Producto Interno Bruto.

USD: Dólar de Estados Unidos (United States Dollar).

LI: Líquido Iónico.

AIL: Líquido Iónico Aprótico (Aprotic Ionic Liquid).

PIL: Líquido Iónico Prótico (Protic Ionic Liquid).

[EMIM] [Ac]: Acetato de 1 – etil – 3 – metilimidazol.

2 – HDEAA: Acetato de 2 – hidroxidietilamonio.

2 – HEAA: Acetato de 2 – hidroxietilamonio.

2 – HEAF: Formato de 2 – hidroxietilamonio.

MO: Microorganismo.

SHF: Hidrólisis y Fermentación por Separado.

SSF: Sacarificación y Fermentación Simultánea.

UTFSM: Universidad Técnica Federico Santa María.

2 – HEAL: Lactato de 2 – hidroxietilamonio.

2 – HDEAox: Oxalato de 2 – hidroxidietilamonio.

FPU: Unidades de papel filtro.

RPM: Revoluciones por minuto.

CBU: Unidades de celobiosa.

DNS: Ácido Dinitrosalicílico.

GC: Cromatógrafo de gases.

# I. Introducción

## I.1. Motivación

### I.1.i. Agotamiento del petróleo y crisis energética

En la actualidad, el petróleo y sus derivados son la principal fuente de recursos energéticos a nivel mundial. Este combustible fósil se formó hace millones de años a partir de residuos orgánicos que se convierten en petróleo por diversas reacciones químicas. A mediados del siglo XIX se desarrolló su mayor potencial energético, al inventarse el motor de combustión interna que funciona con un destilado de petróleo crudo, la gasolina. Esta fuente barata y abundante de energía, ayudó en una rápida expansión de la industria, el transporte, el comercio y la agricultura<sup>[1]</sup>.

Sus aplicaciones son múltiples, como la generación eléctrica y usos industriales, siendo principalmente utilizado como combustible para transporte<sup>[2]</sup>. Esta versatilidad genera que la demanda por combustibles fósiles sea cada vez mayor, además de verse incrementada con el crecimiento de la población mundial, y se proyecta que siga creciendo alrededor de un 50% más al año 2050<sup>[47]</sup>. Esta tendencia se ve en la figura I – 1.

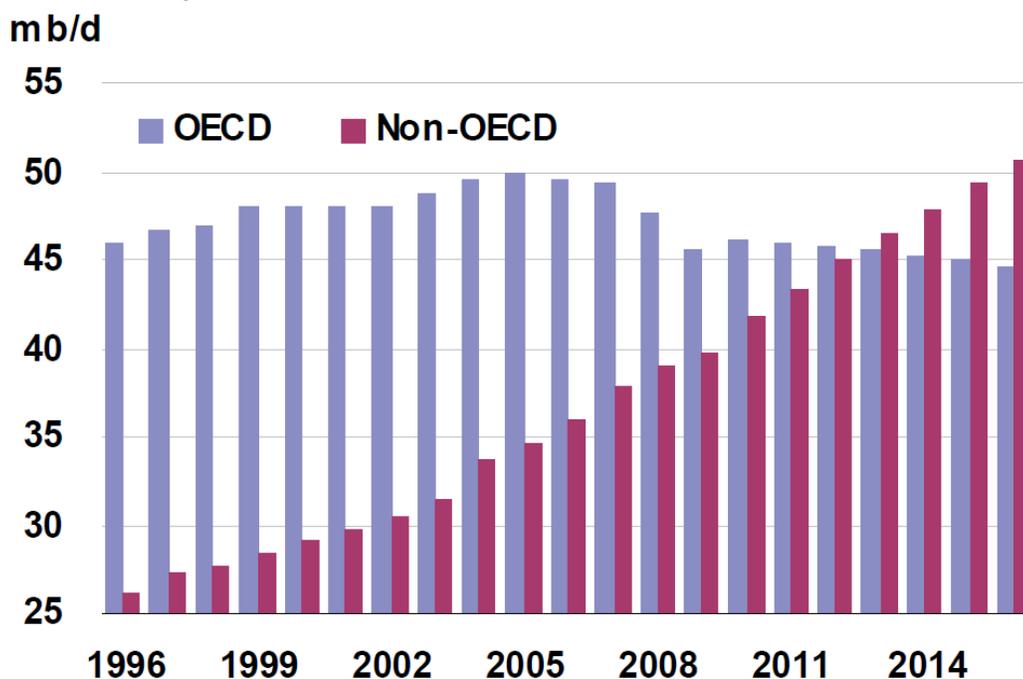


Figura I-1: Demanda mundial de petróleo en miles de barriles por día (Fuente: Adaptación Agencia Internacional de Energía, IEA<sup>[2]</sup>).

Debido a su origen y al tiempo necesario para formarlo, el petróleo es un recurso natural finito. Es por esto que existe una fuerte preocupación por el abastecimiento de petróleo, dado que desde la mitad del siglo XX comenzó a abrirse una brecha entre la producción de petróleo y su demanda. Este fenómeno es conocido como “pico del petróleo” anunciado en 1956 por el geofísico estadounidense Marion King Hubbert. Esta teoría indicaba que la producción de petróleo EE.UU. alcanzaría su máximo en la década de 1970<sup>[3]</sup>.

Algunos países ya han alcanzado el máximo de su generación de petróleo, lo que sugiere que el máximo de producción a nivel mundial es inminente<sup>[4]</sup>, como se ve reflejado en la figura I – 2.

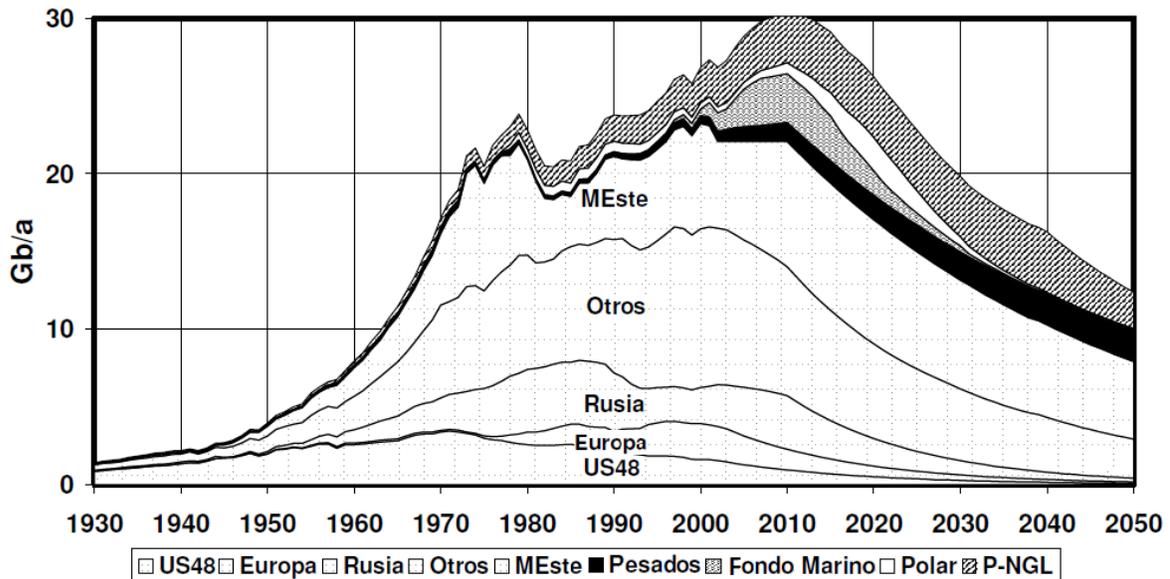


Figura I-2: Producción mundial de petróleo en gigabarriles por año (Fuente: Adaptación ASPO<sup>[4]</sup>)<sup>a</sup>.

Es por esto que surge la necesidad de encontrar nuevas fuentes de energía, de modo de suplir la demanda que la producción de petróleo no puede abastecer.

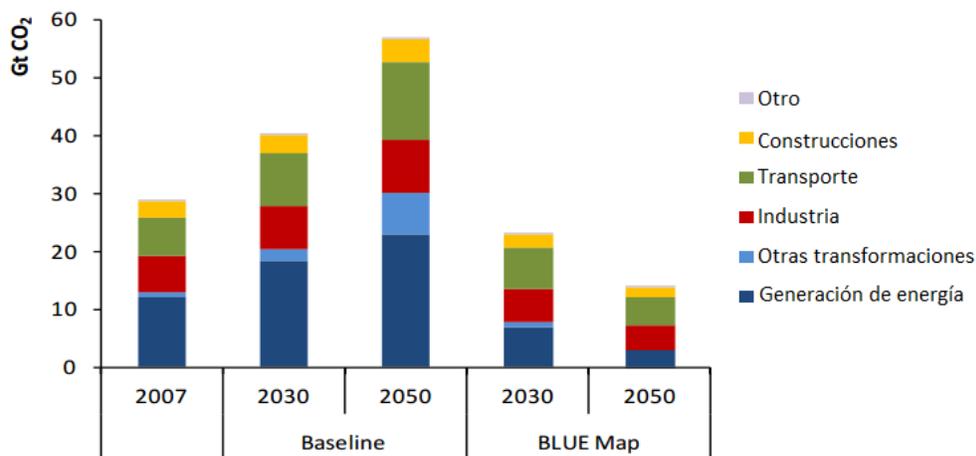
### I.1.ii. Problema medioambiental

El clima de la tierra tiende a cambiar debido a alteraciones en la composición química de la atmósfera. El consumo de combustibles fósiles genera gases contaminantes para el medio ambiente, como monóxido de carbono (CO), metano (CH<sub>4</sub>), óxidos de Nitrógeno (NO<sub>x</sub>) y principalmente dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Estos compuestos tienen la propiedad de atrapar el calor, incrementando la temperatura global de la tierra. Este efecto producirá cambios en los sistemas de circulación del aire, distribución y frecuencia de las lluvias, la desaparición de los glaciares y el incremento del nivel medio del mar, entre otros<sup>[5]</sup>.

Un estudio de la Agencia Internacional de Energía (IEA) realizado en el año 2009<sup>[6]</sup> mostró que el 43% de las emisiones de CO<sub>2</sub> de la combustión de combustible se produce a partir de carbón, 37% de petróleo y 20% de gas natural. Según la publicación de Perspectivas de Tecnología Energética del año 2010<sup>[7]</sup> de la misma IEA, si se toman medidas de mitigación de emisiones de dióxido de carbono en el presente para todas las aplicaciones de los combustibles fósiles, será posible que al año 2050 el nivel de emisiones sea equivalente a la mitad de lo producido el año 2005. Un escenario muy distinto se tiene en el caso de que no se tomen medidas, tal como se puede ver en la figura I – 3. El escenario base (baseline scenario) consiste en seguir como referencia lo propuesto en el World Energy Outlook 2009<sup>[42]</sup>, considerar el crecimiento del PIB mundial en un factor de 2,75 entre 2007 y 2050 y suponer el precio de la energía como USD 120/barril para el petróleo y USD 115/tonelada para el carbón. En cuanto al escenario

<sup>a</sup> US48 corresponde a los 48 estados contiguos de los Estados Unidos [41]

BLUE, se considera una reducción del 50% de las emisiones de CO<sub>2</sub> relacionadas con la energía para el año 2050 en comparación con el año 2005, además de reducciones marginales en los precios de hasta USD 175 / ton CO<sub>2</sub>, entre otras variables <sup>[7]</sup>.

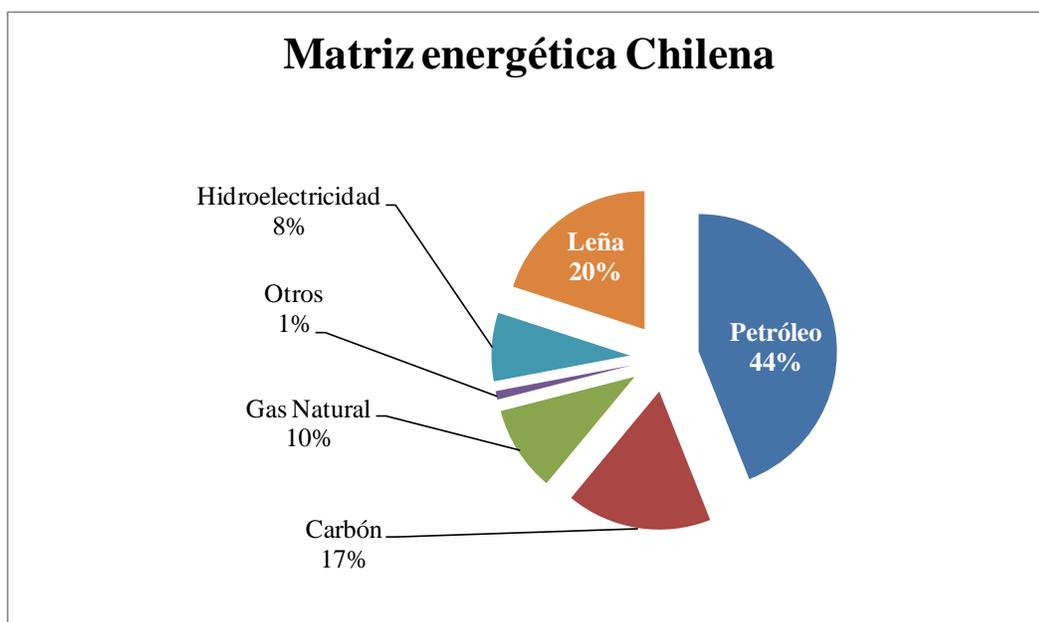


**Figura I-3: Proyección de emisiones sin medidas de mitigación (Baseline) y con medidas de mitigación (BLUE Map) (Fuente: Adaptación IEA, Energy Technology Perspective, 2011<sup>[7]</sup>).**

Debido a lo anterior, es importante encontrar sustitutos de los combustibles fósiles que permitan disminuir la generación de gases de efecto invernadero.

### I.1.iii. Dependencia de combustibles fósiles en Chile

Actualmente en Chile, la matriz energética está formada principalmente por petróleo y leña, y solo un 1% de fuentes renovables. Lo anterior significa que los combustibles fósiles representan un 71% del total de la matriz energética <sup>[8]</sup>. La distribución se puede ver claramente en el gráfico de la figura I – 4:



**Figura I-4: Distribución de la matriz energética en Chile al año 2012 (Fuente: Gobierno de Chile <sup>[8]</sup>)**

Debido a que no se tienen recursos propios, Chile posee una fuerte dependencia de la importación de combustibles fósiles. Peor escenario se observó luego de las restricciones en las importaciones de gas natural traído desde Argentina, lo que causó una crisis en el abastecimiento de las fuentes energéticas a nivel nacional. Lo anterior gatilla el interés por encontrar recursos que permitan diversificar la matriz energética nacional de manera que ésta se pueda autoabastecer.

## **I.2. Marco teórico**

### **I.2.i. Biocombustibles y bioetanol**

Se entiende por biocombustible a aquellos combustibles que se obtienen en forma sustentable de biomasa, es decir, de organismos recientemente vivos o sus desechos metabólicos y que son producidos a partir de materias primas de origen principalmente vegetal, siendo éste agropecuario, agroindustrial, desechos orgánicos, desechos forestales, macro y micro algas <sup>[9,10]</sup>. Su uso genera una menor contaminación ambiental, ya que el CO<sub>2</sub> generado en la combustión del biocombustible es fijado por la biomasa al crecer, a través del proceso de fotosíntesis. Así, la emisión neta de CO<sub>2</sub> es aproximadamente nula <sup>[11]</sup>. Es por esto que los biocombustibles son una alternativa viable al agotamiento de energías fósiles, como el gas y el petróleo, teniendo en cuenta que no se agoten los suelos ni se contaminen tanto los campos de cultivo como los ecosistemas acuáticos <sup>[9]</sup>.

Respecto de los combustibles fósiles, los biocombustibles tienen ciertas ventajas que les permitirían crecer más en el corto plazo. Entre otras, permiten la redistribución de terrenos excedentes del sector agrícola a cultivos energéticos, disminuyen la contaminación por gases de efecto invernadero, generan oportunidades económicas en el medio rural, disminuyen la dependencia externa del abastecimiento de combustibles y se adaptan a las tecnologías de motores actuales <sup>[9,11]</sup>. Por otro lado, los biocombustibles presentan desventajas que pueden reducir el interés en la generación de éstos, tal como la baja densidad energética, rendimientos de las calderas algo inferiores a los a que usan un combustible fósil, y que los sistemas de alimentación de combustible y eliminación de cenizas son más complejos <sup>[11]</sup>.

Las fuentes de bioenergía pueden ser biomasa tradicional quemada directamente, tecnologías a base de biomasa para generar electricidad, y biocombustibles líquidos para el sector de transporte. En particular, los biocombustibles líquidos proporcionan actualmente la energía equivalente a 20 millones de toneladas de petróleo (el 1% del combustible utilizado mundialmente para transporte por carretera)<sup>b</sup>.

Los biocombustibles conocidos hasta ahora son el biodiesel, bioetanol y biogás. El biodiesel es un combustible compuesto por el éster de un ácido graso que es elaborado a partir de aceites vegetales o animales, apto como sustituyente del Petróleo en motores Diesel. El biodiesel se puede extraer del Raps, Soya y otras oleaginosas, como también aceites usados y de la grasa animal<sup>[12]</sup>. Por su parte, el biogás es una mezcla gaseosa producida por la descomposición de la materia orgánica, compuesto principalmente por metano (CH<sub>4</sub>) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), que se producen por digestión de la materia orgánica en ausencia de aire por la acción de microorganismos <sup>[13]</sup>. Finalmente, el bioetanol es un alcohol proveniente de la fermentación de glucosa que se recupera por medio de un proceso de destilación<sup>[16]</sup>. Se puede extraer

---

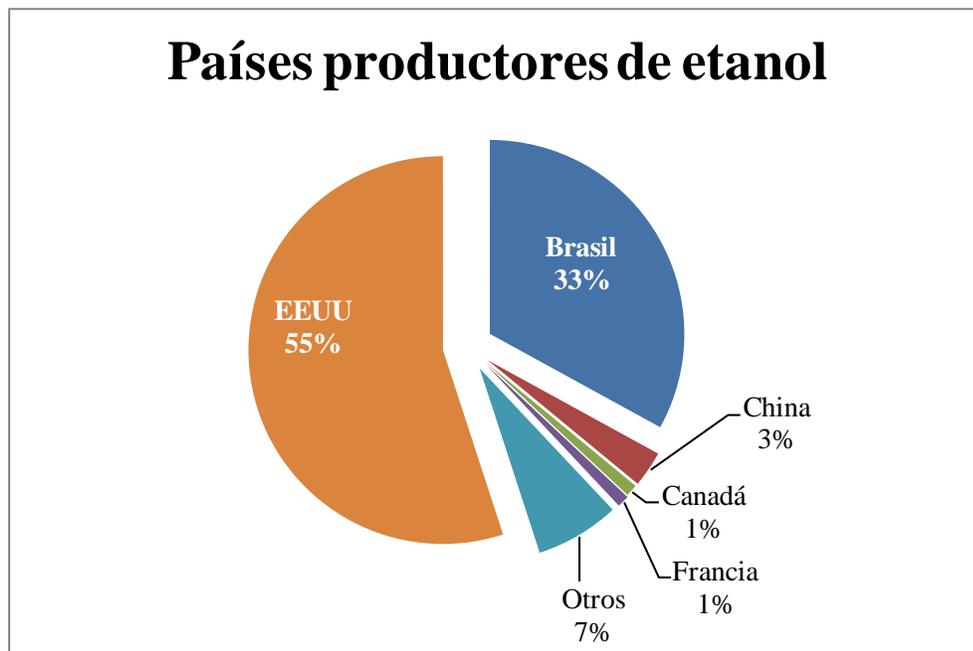
<sup>b</sup>Comité de Seguridad Alimentaria Mundial, 2007

de cereales, papa, caña de azúcar, biomasa forestal, residuos pecuarios, residuos de las cosechas y las agroindustrias.

El bioetanol se clasifica en tres tipos de acuerdo a la biomasa utilizada:

- De primera generación: A partir de caña de azúcar o de almidón. Tienen la desventaja de competir con el uso de estos como alimentos y por las tierras de cultivo <sup>[14]</sup>.
- De segunda generación: A partir de biomasa lignocelulósica. Tiene la desventaja de requerir pre tratamiento <sup>[17]</sup>.
- De tercera generación: A partir de macro algas. Tiene la desventaja de estar aún en fase experimental, por lo que no son aplicables en escala industrial hasta el momento, además de no ser rentables <sup>[15]</sup>.

En la actualidad, los motores convencionales aceptan hasta un 10% de reemplazo de gasolina por bioetanol sin necesidad de hacer cambios en los motores <sup>[16, 17]</sup>, lo que ha generado un mercado de interés mundial. La producción de este biocombustible ha crecido durante los últimos veinte años a una tasa del 9% anual y su producción global durante el 2010 se estima en 83.000 millones de litros <sup>[18]</sup>. En la figura I-5 se observa la participación por países hasta el año 2012, siendo Estados Unidos y Brasil los principales productores de bioetanol <sup>[19]</sup>.



**Figura I-5: Países productores de etanol y su participación en el mercado (Fuente: Adaptación CEPAL <sup>[18]</sup>).**

El bioetanol producido por estos países es principalmente de primera generación. La producción a gran escala de bioetanol de segunda generación está todavía en fase de estudio, pues la instalación y operación de una planta de este tipo conlleva altos costos, tanto de inversión como de operación. Esto se debe a que la biomasa lignocelulósica requiere de pretratamiento, las enzimas son poco efectivas y la destilación consume una cantidad considerable de energía. Es por esto que la inversión para plantas de bioetanol lignocelulósico es de tres a cuatro veces mayor que en caso de etanol de primera generación <sup>[20]</sup>.

## I.2.ii. Biomasa lignocelulósica

La industria de producción de bioetanol utiliza el término biomasa lignocelulósica cuando la materia prima para la obtención de glucosa a fermentar es la celulosa. Las materias primas compuestas de biomasa lignocelulósica son las más abundantes en el mundo, por lo que representan la fuente de azúcares con mayor potencial para la producción de bioetanol de segunda generación <sup>[21,24]</sup>.

En la biomasa lignocelulósica, la pared celular está formada por lignocelulosa en composición y porcentajes variables<sup>c</sup>. Las fibras de celulosa están contenidas en una matriz tridimensional de lignina y de hemicelulosa que a su vez forman la pared celular de la célula vegetal, tal como se ve en la figura I – 6. En ella, es posible observar las macrofibrillas compuestas por cadenas de hemicelulosa y lignina.

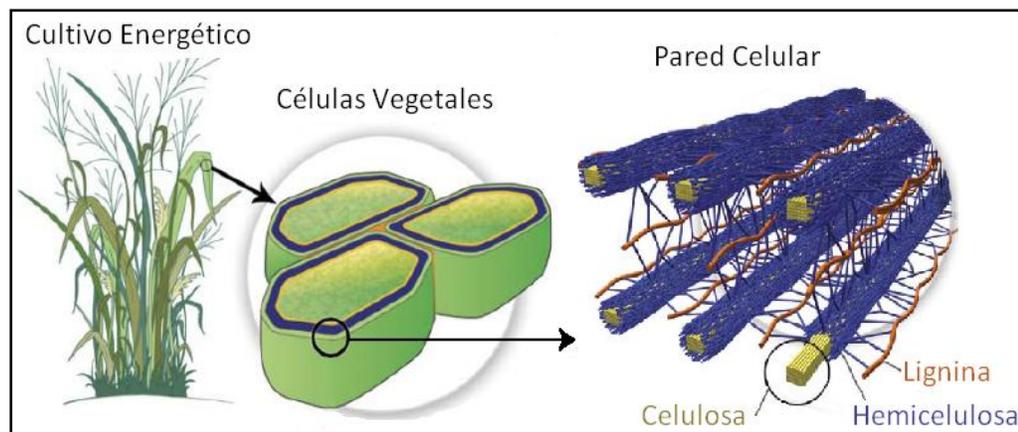


Figura I-6: Esquema de la matriz lignocelulósica <sup>[21]</sup>.

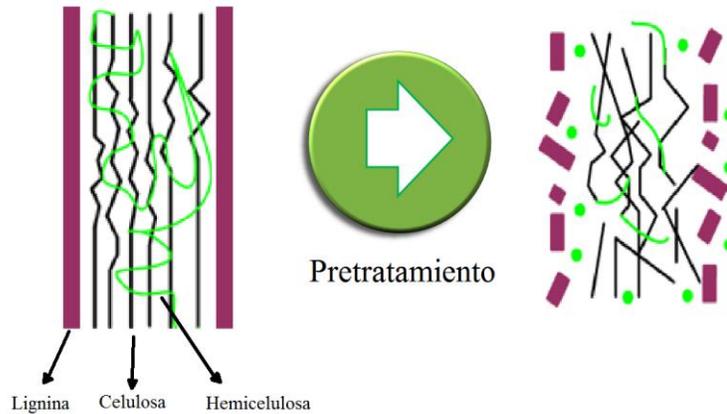
En cuanto a su estructura, la celulosa es un polímero de D-glucosas unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas). Éstas se encuentran unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la acción enzimática, lo que le entrega elasticidad. Por otra parte, la hemicelulosa es un polímero complejo formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) en que los azúcares están unidos por enlaces  $\beta$ -1,4. Finalmente, la lignina es un heteropolímero ramificado formado por alcoholes aromáticos que da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales y es altamente resistente a la degradación química y biológica <sup>[22]d,e</sup>.

Debido principalmente a la presencia de lignina en la estructura de la biomasa lignocelulósica, se requiere un pre tratamiento que logre removerla, para hidrolizar la hemicelulosa a azúcares fermentables y reducir la cristalinidad de la celulosa, de modo de liberar y facilitar la hidrólisis de glucosa (ver figura I – 7).

<sup>c</sup>Detalle de la composición de distintas biomazas en anexo A.

<sup>d</sup>Representación de las estructuras lignocelulósicas en el anexo B.

<sup>e</sup> Composición porcentual de la materia lignocelulósica en anexo A.



**Figura I-7: Esquema de biomasa antes y después del pre tratamiento (Fuente: Adaptación Heat Exchangers <sup>[23]</sup>).**

### I.2.iii. Proceso de producción de bioetanol

Considerando los antecedentes anteriores y poniendo el foco en el bioetanol, es importante conocer su proceso de producción. Este se representa en el diagrama de bloques de la figura I – 8:



**Figura I-8: Esquema de producción de bioetanol de segunda generación.**

Los principales factores que afectan la producción de bioetanol son el tipo de materia prima, el tipo de pretratamiento a utilizar y la estrategia de fermentación. A continuación, se explicarán en detalle cada bloque del proceso anterior.

#### 1. Biomasa y acondicionamiento:

La biomasa corresponde a la materia prima a utilizar y dependiendo de su tipo es que el bioetanol será de primera, segunda o tercera generación. En el caso de la biomasa lignocelulósica, la materia prima

puede provenir de madera, residuos de paja de trigo o maíz, bagazo de caña de azúcar, residuos de industria papelera y residuos urbanos <sup>[24]</sup>. La elección de la biomasa a utilizar es determinante, en el sentido de que define la proporción de celulosa y hemicelulosa disponible, y por ende, la cantidad de azúcares teóricos máximos que pueden ser fermentados <sup>[25]</sup>.

El acondicionamiento de la biomasa se refiere a la reducción de tamaño de la materia prima, para aumentar su área superficial, facilitar el acceso de las enzimas a las fibras de celulosa y aumentar la conversión a glucosa <sup>[22]</sup>. El tamaño óptimo para la molienda de biomasa ha sido determinado anteriormente (denominado “pin-chip”), y en el caso del eucalipto, este tamaño corresponde a 0,5-1 mm de ancho, 0,5-1 de espesor y 10-20 mm de largo (imagen de un molino para eucalipto en el anexo H). Para obtener este tamaño se requiere utilizar tamices, en los que queda retenido el material de cierto tamaño dependiendo del número del tamiz <sup>[21]</sup>.

## 2. Pretratamiento:

La finalidad de esta etapa del proceso es remover la lignina y la hemicelulosa, además de reducir la cristalinidad de la celulosa e incrementar la porosidad del material. Esto, de modo de mejorar la liberación de azúcares y evitar la degradación o pérdida de carbohidratos, así como la formación de compuestos inhibitorios para la posterior fermentación <sup>[22]</sup>. Existen variados tipos de pretratamiento, con mayor o menor efectividad, los que se muestran en la tabla I – 1.

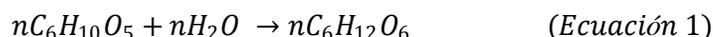
**Tabla I-1: Tipos de pretratamiento, ventajas y desventajas <sup>[21,22]</sup>.**

Método	Tipo	Ventaja	Desventaja
<b>Físico</b>	Fragmentación mecánica y Pirolisis	Es un método eficiente en la degradación del material.	Comparativamente, el costo es elevado.
	Explosión por vapor	Efectivo para maderas duras y desechos agrícolas. Bajo requerimiento de energía comparado con métodos físicos.	Destrucción parcial de xilano, separación incompleta de la lignina y generación de compuestos inhibitorios para la fermentación.
<b>Físico - químico</b>	Explosión de fibra de amoníaco	Es eficiente para sustratos de poca lignina. No se producen inhibidores y no se requiere acondicionamiento.	Requiere reciclaje del amonio y tiene baja eficiencia para maderas duras.
	Ozonólisis	Opera en condiciones ambientales y mejora el rendimiento.	Se requiere una gran cantidad de ozono, lo que eleva los costos.
<b>Químico</b>	Hidrólisis ácida	Mejora la hidrólisis de celulosa.	Reactivos tóxicos, corrosivos y peligrosos. Alto costo y requiere neutralización.
	Hidrólisis alcalina	Mejora en la separación de la lignina.	Altos costos
	Líquido iónico aprótico (AIL)	Buen rendimiento en la hidrólisis de celulosa.	Poco biodegradables, alta higroscopicidad.
	Líquido iónico prótico (PIL)	Baja toxicidad, baja higroscopicidad bajos costos de producción.	Pocos antecedentes en su estudio. Rendimientos de hidrólisis insuficientes respecto a algunos AILs.
<b>Biológico</b>	Degradación con hongos.	Alto rendimiento, condiciones de operación moderadas, poca generación de compuestos tóxicos y mínima demanda de energía.	Proceso lento (2 a 6 semanas).

Como se puede observar, estos métodos de pretratamiento tienen varios inconvenientes, como requerir equipos especializados para proporcionar condiciones extremas necesarias de pretratamiento. Además, la mayoría de estos métodos generan contaminantes tóxicos cuando se utilizan. Un método de pretratamiento eficiente debe tener bajos requerimientos de energía, condiciones modestas y utilizar disolventes totalmente reciclables <sup>[26]</sup>. El interés de este trabajo se centra en el pretratamiento con Líquidos iónicos (LI), los que se describirán más adelante.

### 3. Sacarificación y fermentación:

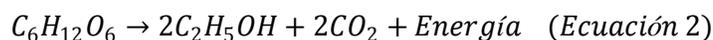
Luego del pretratamiento, es necesario convertir las fibras de celulosa en monómeros de azúcares fermentables. En la hidrólisis (sacarificación) se descomponen las macromoléculas complejas a unidades más simples de azúcares mediante algún agente químico o biológico en presencia de agua (Ecuación 1) <sup>[25]</sup>. En el caso de eucalipto el número de monómeros de glucosa en la celulosa (n) es de aproximadamente 10.000 <sup>[21]</sup>.



A lo largo de la historia se ha realizado la etapa de sacarificación por medio de hidrólisis ácida, que alcanza un máximo de glucosa de 60%, pero genera compuestos tóxicos para los microorganismos fermentadores <sup>[32]</sup>. La hidrólisis enzimática, por otro lado, se lleva a cabo por medio de enzimas. Este tipo de hidrólisis presenta ventajas frente al tipo químico, entre las que cuentan la baja toxicidad de los productos, menores los costos (debido a que opera en condiciones normales), no produce compuestos inhibidores de la fermentación y se pueden obtener rendimientos cercanos al 100%. En cuando a sus inconvenientes, considera un alto tiempo de reacción y los precios de las enzimas son mayores que el ácido <sup>[33]</sup>.

Los catalizadores de la hidrólisis enzimática son llamados celulasas. Hay tres tipos de celulasas con diferentes especificidades que actúan en sinergismo para hidrolizar la celulosa: las endoglucanasas, que cortan la celulosa en regiones amorfas, disminuyendo el largo de las cadenas e incrementando los azúcares reductores; las exoglucanasas que actúan sobre los extremos reductores y no reductores de las cadenas, liberando glucosa o celobiosa; y las  $\beta$ -glucosidasas que hidrolizan la celobiosa y las celodextrinas para liberar moléculas de glucosa (mecanismo de hidrólisis en Anexo C) <sup>[33, 34]</sup>.

La fermentación, por su parte, corresponde a un proceso mediante el cual un microorganismo obtiene energía gracias a la degradación de hidratos de carbono. Para la generación de bioetanol, se lleva a cabo la fermentación del tipo alcohólica, en la cual los microorganismos (MO) degradan la glucosa en etanol, dióxido de carbono y energía (Ecuación 2) <sup>[21]</sup>. El MO utilizado puede ser selectivo de uno o varios azúcares <sup>[24]</sup>. Generalmente, se usa cepas de *Saccharomices cerevisiae* que son más tolerantes a altas concentraciones de etanol, presenta rendimientos superiores a 0,44 [gr de etanol/gr de glucosa asimilada], en condiciones óptimas, y resiste concentraciones de etanol superiores a 12 [g/l] <sup>[21]</sup>.



Es importante mencionar que para esta etapa del proceso existen variadas configuraciones. Las más utilizadas en la actualidad son la Hidrólisis y Fermentación por Separado (SHF) y la Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF). La configuración SHF consiste en un proceso donde la hidrólisis y la fermentación se realizan en reactores diferentes. La principal ventaja en este tipo de procesos es que cada etapa puede ser llevada a cabo en sus condiciones óptimas de pH y temperatura, pero tiene la desventaja de que se acumula glucosa y celobiosa en la etapa de hidrólisis, lo que inhibe a las celulasas, obteniéndose

bajos rendimientos de sacarificación<sup>[35]</sup>. En el caso de la SSF, la hidrólisis y la fermentación suceden en un mismo reactor, donde la glucosa liberada durante la hidrólisis es metabolizada continuamente a etanol por las levaduras, lo que minimiza la inhibición de la actividad de las celulasas, obteniendo rendimientos de hidrólisis más altos, menor necesidad de enzima, reducción del tiempo de proceso y mayor productividad de etanol. El mayor inconveniente es que las condiciones óptimas de pH y temperatura en las etapas de hidrólisis y fermentación son diferentes y se deben fijar condiciones de compromiso entre ambas. Además, es importante controlar la inhibición del MO por concentración de etanol<sup>[22, 35]</sup>.

Según un estudio realizado en la Universidad Técnica Federico Santa María (UTFSM), el rendimiento teórico de este proceso en litros de etanol/ton de materia prima, es 280 para etanol a partir trigo y 370 para etanol a partir de maíz. Los costos de inversión asociados a la implementación de este tipo de tecnologías en Chile es del orden de 670 USD por m<sup>3</sup> de combustible al año, mientras que el costo de operación y mantenimiento depende principalmente de la materia prima utilizada (64%) y otros componentes como son energía (17%) y químicos (11%)<sup>[38, 44]</sup>.

#### **4. Destilación y deshidratación**

El objetivo de este proceso es separar el etanol del agua mediante calor en una columna de destilación. Como el etanol es una sustancia más volátil que el agua (su presión de vapor es menor), a cierta temperatura de operación (ubicada entre los puntos de ebullición de cada sustancia disuelta) se va obteniendo vapor cada vez más rico en etanol al ir recorriendo la columna hacia arriba. Una vez se enfría el vapor, se obtiene el etanol deseado<sup>[24]</sup>.

#### **I.2.iv. Líquidos iónicos**

Como fue mencionado anteriormente, es de interés para este trabajo el pretratamiento químico a partir de Líquidos iónicos (LI). Estos son sales que se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente y que están compuestos únicamente por iones. Muchos de ellos están formados por un gran catión orgánico y un anión pequeño, que puede ser orgánico o inorgánico<sup>[27, 28]</sup>.

El mecanismo con que operan los LI involucra los átomos de hidrógeno y oxígeno en los enlaces intramoleculares de la matriz lignocelulósica, en la formación del complejo dador –aceptor de electrones. En esta interacción (ver figura I – 9), los átomos de oxígeno de la celulosa sirven como par electrón-dador y los átomos de hidrógeno actúan como un aceptor de electrones. Así mismo, el catión del líquido iónico actúa como aceptor de electrones y el anión como centro dador de electrones. Luego, los átomos de oxígeno e hidrógeno son separados, lo que lleva a la apertura de los enlaces de hidrógeno entre las cadenas intramoleculares y la correspondiente disolución de la celulosa<sup>[25]</sup>.

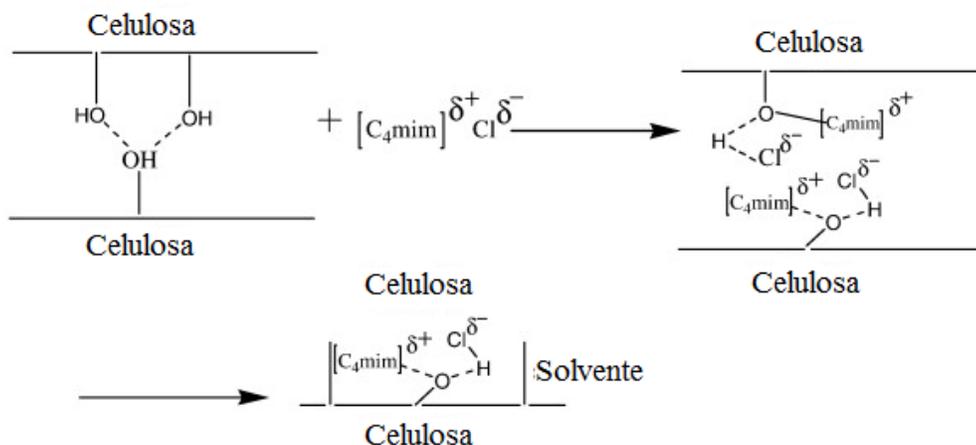


Figura I-9: Mecanismo de acción de los Líquidos Iónicos <sup>[25]</sup>.

Los líquidos iónicos poseen ciertas ventajas sobre los solventes orgánicos convencionales, como una alta estabilidad térmica y química, alta conductividad eléctrica, baja volatilidad y que no son inflamables. Algunas de estas características son generales para todos los líquidos iónicos, y otras solo se encuentran en LI específicos, dependiendo de los iones que lo conformen <sup>[29, 30, 31]</sup>.

Al parecer, los LI son altamente polares debido a su carácter iónico, dando como resultado una mayor capacidad de disolución de polímeros que otros disolventes. Se ha demostrado que los líquidos iónicos son capaces de disolver tanto la lignina como la celulosa, lo que se determina principalmente por la polaridad y la capacidad de unión de hidrógeno del LI, además de estar influenciado por la temperatura de fusión y la viscosidad. El tamaño de los aniones y cationes que forman el LI y su capacidad para formar puentes de hidrogeno, son parámetros que juegan un rol muy importante en la capacidad de disolución de celulosa. Cationes pequeños son más eficientes en disolver celulosa que cationes más grandes, y si el catión es muy grande disminuye la capacidad del LI de formar puentes de hidrogeno <sup>[26]</sup>.

Existen un número potencial de combinaciones de iones para la formación de líquidos iónicos alcanza cerca de  $10^{12}$ . Los iones más utilizados en los LI se muestran en la figura I – 10:

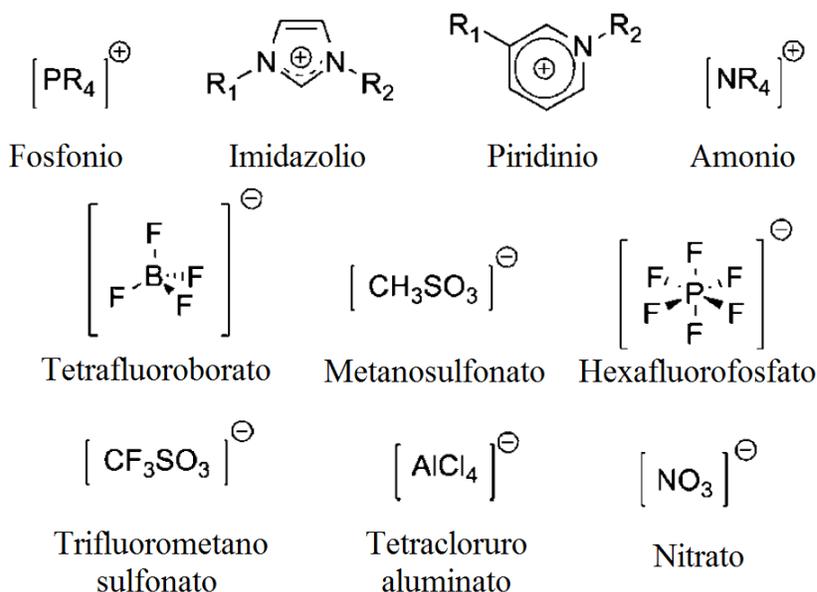
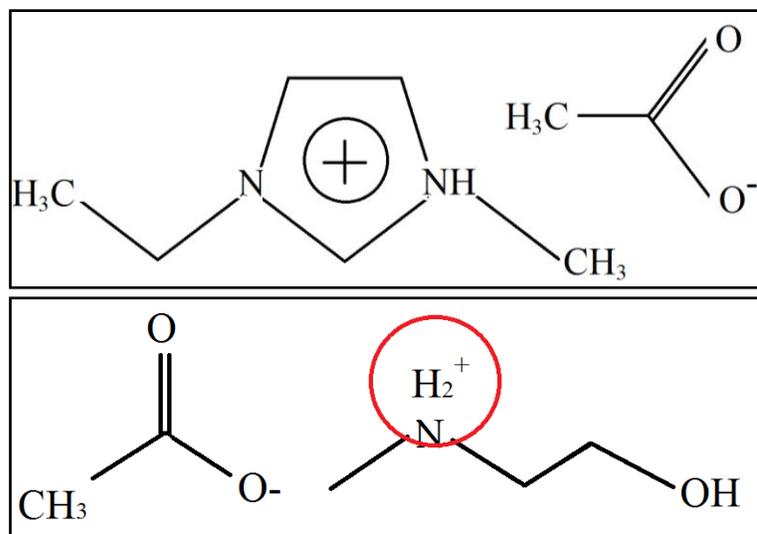


Figura I-10: Aniones y cationes usados generalmente en la formación de AILs <sup>[30]</sup>.

Hasta ahora, los cationes más eficaces en la disolución de lignocelulosa se basan en metilimidazolio y núcleos metilpiridinio, con alil-, etil-, butil- o cadenas laterales. En cuanto a los aniones, los más prometedores han sido el cloruro, acetato y formato <sup>[30]</sup>. Existen dos tipos de líquidos iónicos: los líquidos iónicos próticos (PIL, por sus siglas en inglés) o sales de Bronsted, y los líquidos iónicos apróticos (AIL) o convencionales <sup>[36]</sup>. Estos se diferencian en que los primeros presentan un protón disponible en el catión para establecer un enlace de hidrógeno con las uniones entre las fibras de celulosa. Distinto es el caso de los AILs donde el mecanismo se produce debido a la carga de sus iones <sup>[28]</sup>. En la Figura I – 11 se muestran dos ejemplos de estructuras de líquidos iónicos, donde en rojo se encuentra el protón que diferencia ambos tipos de líquidos iónicos.



**Figura I-11: Estructura del AIL [EMIM] [Ac] (arriba) y del PIL 2 – HEAA (abajo) <sup>[21, 37]</sup>.**

Diversos estudios han demostrado que el AIL [EMIM] [Ac] es un prometedor solvente, debido principalmente a una mayor basicidad en la formación del enlace de hidrógeno. Además, se ha demostrado que [EMIM] [Ac] es capaz de eliminar considerablemente la lignina de la biomasa lignocelulósica. Estudios en residuos de algodón con distintos AILs probaron que el material pretratado con [EMIM] [Ac] muestra mayor rompimiento de la estructura que el material pretratado con otros AIL. Además, se ha demostrado que un tiempo prolongado y una alta temperatura de pretratamiento con este líquido iónico mejora la extracción de lignina y la hidrólisis de celulosa <sup>[29]</sup>. Sin embargo, el precio de estos LIs aún es alto, debido a que se producen en baja escala. Aunque LIs son prometedores para el pretratamiento de lignocelulosa, es necesario eliminar completamente todos los residuos de LI del material antes de la hidrólisis debido a que tienen el potencial para desactivar celulosa <sup>[26]</sup>.

Por otro lado, a lo largo del tiempo las investigaciones se han orientado de forma muy importante hacia los AIL, apareciendo desde hace apenas unos años un creciente interés en los PIL. Las razones radican en su modo de síntesis química más simple, menor costo de producción, perfil toxicológico mucho más aceptable, y mejor biodegradabilidad <sup>[36]</sup>. Algunos de ellos son el acetato de 2-hidroxi-etilamonio (2-HEAA), acetato de 2-hidroxi-etilamonio (2-HEAA) y formato de 2-hidroxi-etilamonio (2-HEAF). En cuanto a este último, Nazife et al <sup>[29]</sup> comparó el comportamiento del pretratamiento de tallos de algodón con distintos LI, entre ellos 2 – HEAF, [EMIM] [Ac] y [EMIM] [Cl], con el fin de investigar el impacto sobre la estructura lignocelulósica, así como en la digestión durante la hidrólisis enzimática. Se pretrató con una carga de biomasa de 10% p/p a 130°C por 30 minutos. En este estudio, 2 - HEAF causó ligeras modificaciones en la estructura en comparación con el [EMIM] [Ac], el cual produjo considerables

cambios estructurales. Por otro lado, HEAF fue tan eficaz como [EMIM] [Cl] en términos de alteración de la estructura de la biomasa lignocelulósica. Se determinó además, el porcentaje de lignina extraído tras el pretratamiento, la cual fue de 45% para [EMIM] [Ac] y de 38% en el caso del HEAF. En cuanto al efecto en la hidrólisis enzimática, con [EMIM] [Ac] se obtuvo un 68% de digestión de la biomasa al realizar la hidrólisis por 72 h. En el caso del 2 - HEAF, este valor alcanzó un 26%, al igual que en el caso del [EMIM] [Cl], que también llegó a 26%. Estos resultados son importantes, ya que implican que la capacidad de disolver la celulosa no es un requisito previo para que un LI sea un agente de pretratamiento eficaz. Además, la preparación del 2 - HEAF es sencilla y rentable, pues sus componentes son más baratos que los cationes y aniones del AIL. A este respecto, 2 - HEAF podría ser una alternativa favorable al [EMIM] [Cl].

### **I.3. Antecedentes**

#### **I.3.i. Pretratamiento con PIL**

Como fue mencionado en la sección anterior, los líquidos iónicos próticos (PILs) han despertado el interés solo en los últimos años y han sido poco estudiados en lo que respecta a la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos. Las investigaciones se han enfocado principalmente en la caracterización de los PILs, logrando probar su baja toxicidad, bajos costos de producción y la simpleza de la síntesis<sup>[37]</sup>.

En la memoria de título de Loreto Martínez<sup>[21]</sup>, se estudiaron distintas condiciones del proceso productivo del bioetanol a partir de residuos de *Eucalyptus globulus Labill* (eucalipto). Dentro de estas condiciones se probó el uso de líquidos iónicos (LI) en la etapa de pre-tratamiento, tiempos y temperaturas de operación en esta fase, etapa de lavado y etapa de secado, utilizando la estrategia de sacarificación y fermentación simultánea (SSF).

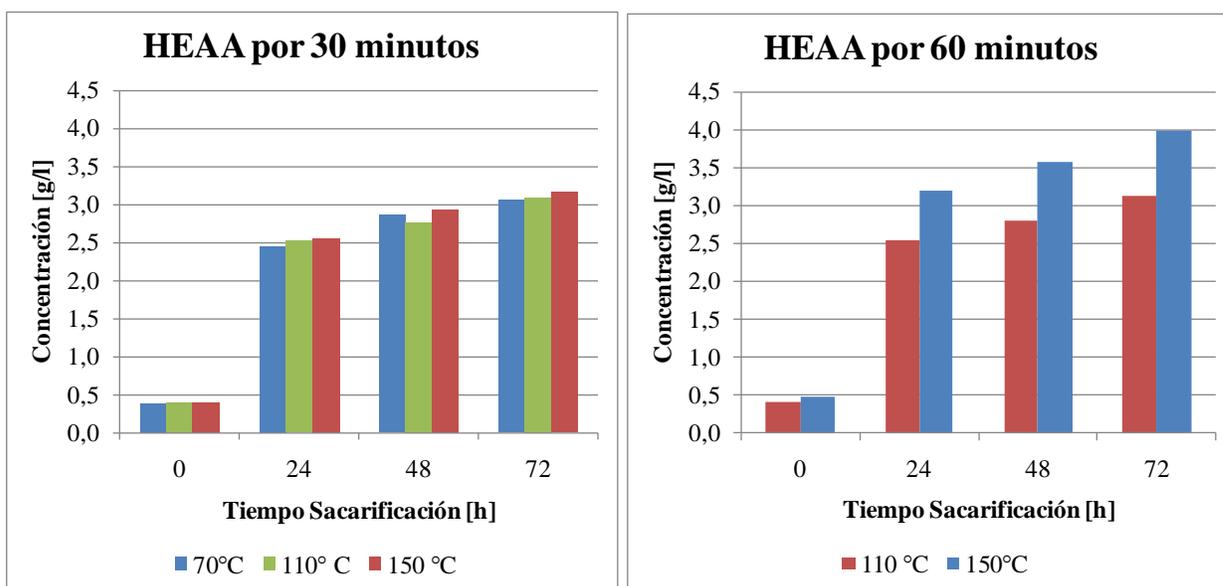
La primera parte de este estudio consistió en utilizar PILs en la etapa de pre-tratamiento, con condiciones de operación de 30 o 60 minutos a 60, 70, 80 y 90°C. Se utilizó acetato de 2-hidroxi-dietilamonio (2-HDEAA) y lactato de 2-hidroxi-etilamonio (2-HEAL), ambos líquidos iónicos próticos, en la etapa de pretratamiento. Solo se realizó una sacarificación, sin fermentación, luego del pretratamiento. El rendimiento se mide con respecto a la glucosa liberada luego de la sacarificación, en comparación con la glucosa potencial, que se calcula en base a la cantidad de celulosa presente en la biomasa utilizada.

En este caso, se obtuvo pequeños aumentos en el rendimiento de la sacarificación con respecto al control negativo (sin pre-tratar). El mejor resultado se obtuvo con 2-HEAL a 70°C, durante 30 minutos, aunque este rendimiento no supera el 4%.

En cuanto a la etapa de lavado, se determinó que 3 lavados consecutivos es lo más eficiente ya que con dos lavados aun se puede encontrar restos del PIL en el material. Respecto a la etapa de secado, la temperatura utilizada no influyó mayormente en los resultados finales, por lo que se consideró 40° como la temperatura estándar para esta fase.

Estudios posteriores <sup>[39]</sup> se realizaron para 70 °C, 110 °C y 150 °C para los PIL 2-hidroxi dietilamonio acetato (2-HDEAA), 2-hidroxi etilamonio acetato (2-HEAA), 2-hidroxi etilamonio lactato (2-HEAL) y oxalato de 2-hidroxi dietilamonio (2-HDEAox), durante 30 y 60 minutos. Posterior al pretratamiento se realizó una sacarificación y se tomaron muestras a las 0, 24, 48 y 72 horas, de modo de determinar cuál de los PIL mencionados genera la mayor concentración de glucosa.

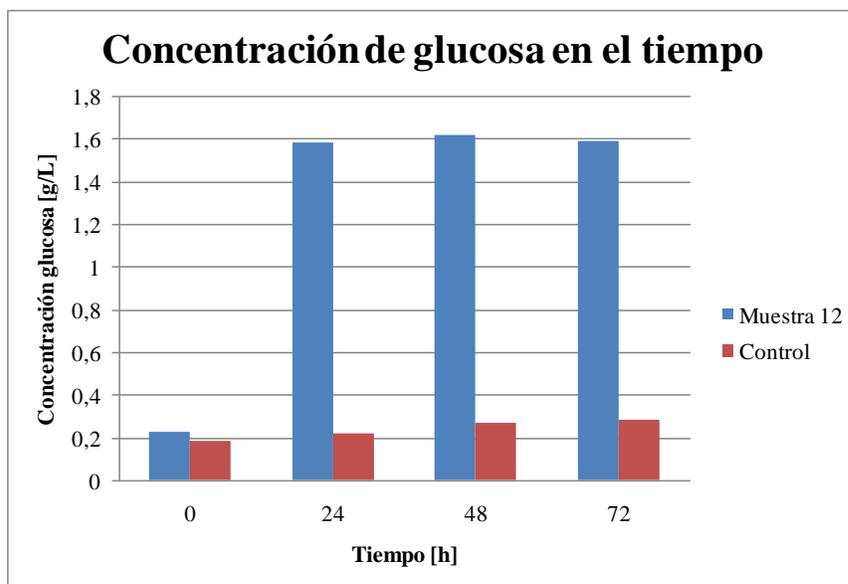
La figura I – 12 muestra el mejor resultado obtenido respecto a la concentración de glucosa al finalizar la sacarificación. Este se obtuvo en el caso del 2- HEAA, pretratado por 60 minutos a 150 °C, logrando alcanzar los 4 g/l en las 72 horas de sacarificación. El material pretratado durante 30 minutos obtuvo el segundo mejor resultado, logrando una concentración máxima de glucosa de 3,2 g/l a las 72 horas de sacarificación.



**Figura I-12: Resultados de concentración de glucosa luego de la sacarificación para material pretratado con HEAA por 30 minutos (izquierda) y por 60 minutos (derecha) a 150 °C, 110 °C y 70 °C <sup>[39]</sup>.**

Luego de ello, se continuó con las experiencias pretratando el material con 2 – HEAA y adicionalmente se probó con un control negativo (material sin pretratamiento). La siguiente etapa de estudio fue experimentar con diferentes temperaturas y tiempos de pretratamiento, para luego sacarificar las muestras. Las temperaturas de pretratamiento evaluadas fueron 150 °C, 170 °C y 185 °C durante 30 y 90 minutos. Se tomaron muestras a las 0, 24, 48 y 72 horas de sacarificación.

La figura I – 13 muestra los mejores resultados luego de la sacarificación. Estos se obtuvieron para el material pretratado durante 90 minutos a 185 °C.



**Figura I-13: Resultados de concentración de glucosa luego de la sacarificación con material pretratado con HEAA por 90 minutos a 185 °C<sup>[39]</sup>.**

Se pudo observar que las concentraciones de glucosa obtenidas fueron muy superiores respecto del control positivo y se mantuvieron casi constantes al aumentar el tiempo de sacarificación. La máxima concentración de glucosa obtenida alcanzó 1,6 g/l.

### **I.3.ii. Sacarificación y fermentación simultánea**

El trabajo de título realizado por Tomas Niklitschek<sup>[25]</sup> comparó las técnicas de sacarificación y fermentación por separado (SHF) y simultáneas (SSF) a partir de residuos de Lenga. En una primera etapa se identificaron los parámetros críticos que afectan el rendimiento de etanol al utilizar la estrategia SSF. En una segunda etapa, se realizó un trabajo experimental sobre éstas y se determinaron las condiciones de operación más favorables en términos de rendimiento en la sacarificación.

En este trabajo se concluyó que las siguientes condiciones de operación pueden generar rendimientos mayores:

- Carga de biomasa en el pre-tratamiento: razón 1:3 p/p (gr biomasa/gr LI).
- Carga enzimática: 37 FPU/gr de material lignocelulósico.
- Microorganismo fermentador: levaduras *S. cerevisiae* cepa RED STAR.
- Temperatura SSF: 40°C.
- Carga de biomasa en la sacarificación y fermentación simultánea: 9% p/v.
- Velocidad de agitación: 300 rpm.
- Surfactante: Tween 20.

Al comparar la SHF con la SSF, Niklitschek obtuvo un aumento del 103% en la producción de etanol con la segunda estrategia, ya que con la primera sólo se logran 72 litros de bioetanol por tonelada de material pretratado, frente a los 146 litros de etanol por tonelada de material pretratado generados por la SSF, es decir, hubo un incremento del 103% en la producción de etanol por la tecnología SSF respecto de la estrategia SHF.

En la memoria de título de L. Martínez <sup>[21]</sup>, luego de establecidas las mejores condiciones obtenidas en las primeras etapas de pretratamiento (utilizando carga biomasa/LI de 1/3 p/p por 30 minutos), se procedió a realizar SSF, con el fin de determinar cuál de las condiciones a evaluar genera mayor producción de bioetanol. El material se pretrató con líquidos iónicos apróticos [EMIM] [Cl] y [EMIM] [Ac]. Las variaciones en las condiciones evaluadas fueron las siguientes:

- Carga de biomasa: 5%, 10% y 15% p/v.
- Metodología de obtención del inóculo de levadura (con y sin propagación).
- LIs utilizado en la etapa de pre-tratamiento.

De lo anterior, lo relevante para este trabajo corresponde a la carga de biomasa aplicada en la SSF. En primer lugar, se observó que utilizar una carga de biomasa de un 15% no es efectivo para este tipo de experimentos, ya que por ser demasiado alta se generan problemas de transferencia de masa y problemas de agitación dentro del matraz.

Los resultados obtenidos para las otras dos cargas de biomasa son los siguientes:

**Tabla I-2: Rendimientos obtenidos en distintas condiciones de SSF <sup>[21]</sup>.**

<b>Carga biomasa</b>	<b>LI</b>	<b>Rendimiento [%]</b>	<b>Rendimiento [gr EtOH/kg material pretratado]</b>	<b>Rendimiento [l EtOH/ton material pretratado]</b>
<b>5%</b>	[EMIM] [Cl]	10	29	37
<b>5% (s/propagación)</b>	[EMIM][Ac]	114	325	412
<b>10%</b>	[EMIM][Ac]	51	145	183

En primer lugar, se puede observar que la segunda configuración entrega rendimientos mayores que los teóricos. Este resultado se puede deber a que las mediciones experimentales presentaban alta desviación estándar. Otra posibilidad es que el [EMIM] [Ac] sea capaz de liberar la glucosa presente en la hemicelulosa <sup>[21]</sup>. En particular, es interesante mencionar que el mayor rendimiento obtenido es superior a lo conseguido en el estudio de la UTFSM mencionado en el capítulo I.3 <sup>[38, 44]</sup>.

La diferencia en los rendimientos entre el [EMIM] [Cl] y el [EMIM] [Ac] se puede deber a una mayor efectividad del [EMIM] [Ac] en el rompimiento de la matriz lignocelulósica o a que posee la mayor cantidad de impurezas, como el agua. También es posible que el ión acetato del [EMIM] [Ac] afecte positivamente en la fermentación, debido a que genera ácido acético. Este efecto puede explicar por qué en los experimentos de SSF con biomasa al 10% se obtienen peores resultados que cuando la carga de biomasa es 5% y se fermenta con *S. cerevisiae* sin propagación. A pesar que el primero presenta mayor cantidad de biomasa, también contiene mayor cantidad residual de [EMIM] [Ac], mayor concentración del ión acetato y por lo tanto se generará una mayor cantidad de ácido acético (estará en mayor concentración). Es posible que debido a su efecto hormético, el aumento en la concentración del ácido acético sea suficiente como para disminuir el rendimiento de la producción de bioetanol.

## **I.4. Objetivos**

### **I.4.i. Objetivo General**

Evaluar el proceso de producción de bioetanol de segunda generación con material pretratado con Líquidos Iónicos Próticos (PILs).

### **I.4.ii. Objetivos Específicos**

- Evaluar el efecto del tiempo de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) que permita mejorar el proceso de producción de bioetanol.
- Evaluar el rendimiento del pre tratamiento con PIL en distintas condiciones.
- Comparar el rendimiento del pretratamiento con PILs respecto al pretratamiento con AILs

## II. Materiales, procedimientos y metodología

### II.1. Materiales

#### II.1.i. Madera

El material lignocelulósico escogido para este trabajo corresponde a residuos de Eucalipto de 10 años de edad (*Eucalyptus globulus Labill*) con chips de 0.5 – 1 mm de espesor, 0.5 – 1 mm de ancho y 10 – 20 mm de largo. Fue proporcionado por la Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza de la Universidad de Chile. Proviene de Melipilla y su humedad relativa es de 24,5% <sup>[42]</sup>.

#### II.1.ii. Líquidos iónicos

Para la realización de este trabajo se utilizó el Líquido Iónico Prótico Acetato de 2-hidroxiethylamonio (2-HEAA) donado por el profesor Miguel Iglesias de la Universidad Federal Da Bahía en Salvador, Brasil. Estos PILs tienen un porcentaje de impurezas menor al 1% y contienen cantidades de agua menores a 500 ppm <sup>[45]</sup>. Se determinó en este trabajo que la densidad de este PIL es de 1,2 g/ml.

Para poder hacer la comparación con los AILs, se utilizó el Acetato de 1-etil-3-metilimidazol ([EMIM] [Ac]), con una pureza del 95% (N° catálogo: 4.90054.0025) tiene una densidad de 1,027 g/ml a 25 °C. Este AIL fue adquirido a la empresa SIGMA-ALDRICH®.

#### II.1.iii. Enzimas

Las enzimas utilizadas en la realización de este trabajo corresponden a:

- Celulasas (Endo y exoglucanasas): vienen del hongo *Trichoderma reesei* su nombre comercial es Cellucast® 1,5L (CatC2730). La actividad de estas enzimas es de 87 FPU/ml, 700 U/gr <sup>[21]</sup>
- Celobiasa (β-glucosidasa): viene del hongo *Aspergillus niger* su nombre comercial es Novozyme® 188 (CatC6105). La actividad de estas enzimas es de 650 CBU/ml, 250 U/gr <sup>[21]</sup>.

Estas enzimas fueron adquiridas en la empresa SIGMA-ALDRICH®.

#### II.1.iv. Microorganismo fermentador

Para la etapa de sacarificación y fermentación simultánea se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se utilizó la cepa Ethanol Red® (RED STAR), la cual fue donada por la empresa S.I. LESAFFRE FERMENTIS.

## II.2. Procedimientos

### II.2.i. Pretratamiento

En esta etapa se pretrataron residuos de eucalipto con acetato de 2- hidroxietilamonio (2-HEAA) y con acetato de 1-etil-3-metilimidazol ([EMIM] [Ac]) como control positivo solo para la temperatura más alta. Realizado este proceso se prosiguió a la etapa de lavado y secado de material.

Las condiciones a variar en el pre-tratamiento son las siguientes:

- Razón biomasa/LI (en p/v): 1/3, 1/6, 1/10.
- Temperatura: 70 °C, 110°C.
- Tiempo de reacción: 1, 3, 5 horas.

Con estas variaciones en las condiciones de operación, se completan 18 ensayos diferentes, cada uno con un experimento para el control positivo, el control negativo (agua destilada, sin pretratamiento) y en duplicado para el pretratamiento con PIL. Así, se realizaron 72 experimentos. El montaje del experimento se observa en la figura II – 1.

Se utilizó como base para cada experimento 1 gr de biomasa húmeda (10% de humedad relativa aprox. <sup>[21]</sup>). El procedimiento a seguir es el siguiente:

1. Pesar 1 gr de biomasa en un vial de vidrio.
2. Pesar la cantidad correspondiente de LI en el mismo vial (según la base de 1 gr de biomasa y la densidad de cada LI).
3. Llevar el vial bien cerrado al baño de silicona termorregulado (previamente preparado a 70 o 110 °C) por 1, 3 ó 5 horas, según corresponda. Es importante cuidar que no entre silicona a los viales, dejando siempre la tapa del vial sobre el borde sobre la silicona.

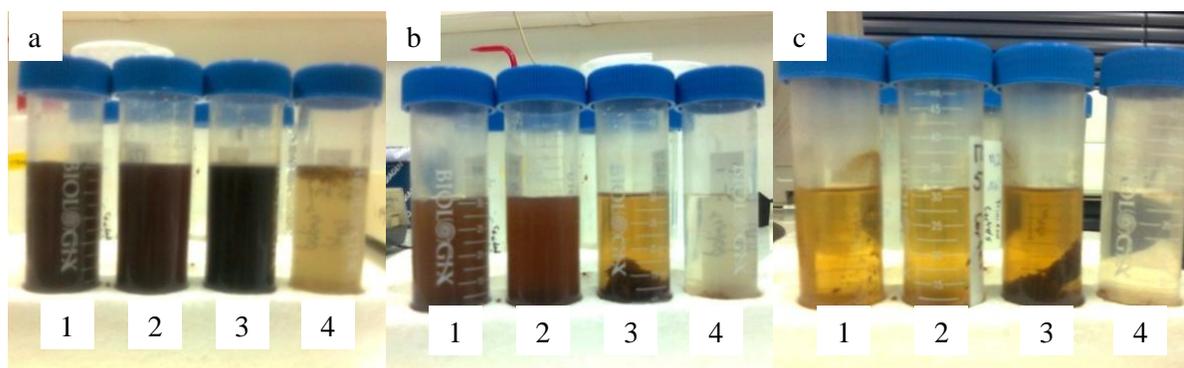


**Figura II-1: Pretratamiento. Derecha: montaje del pretratamiento en el baño termorregulado. Izquierda: viales luego del pretratamiento con PIL y control negativo, respectivamente.**

### II.2.ii. Lavado del material pretratado

En el pre-tratamiento, se produce la disolución de la matriz de celulosa, hemicelulosa y lignina. Por otro lado, es posible que durante esta etapa del proceso se generen compuestos que inhiban la fermentación.

Para separar el Líquido Iónico (LI) y la lignina, y evitar contaminar las etapas posteriores en el proceso, se requiere lavar el material pretratado con agua destilada, tanto si se trata del PIL como del AIL (control positivo). Para ello, luego de completado el tiempo de pretratamiento, se debe lavar en 100 ml agua destilada (100 veces la masa pretratada). Esta etapa se divide en 3 lavados sucesivos en tubos Falcon de 50 ml, completando 33 ml en cada uno. Agregada el agua, se debe agitar el tubo y centrifugar a 8.000 rpm (8.228 g) durante 10 minutos. Luego de la centrifugación, se elimina el sobrenadante compuesto por agua y LI, cuidando de no eliminar biomasa. En la figura II – 2 se observa el cambio de color del sobrenadante una vez se elimina LI en los lavados sucesivos.



**Figura II-2:** Muestras después de cada lavado. Los tubos 1 y 2 de cada imagen corresponden a material pretratado con PIL, el tubo 3 a material pretratado con AIL y el tubo 4 corresponde a material sin pretratamiento. Las imágenes corresponden al primer (a), segundo (b) y tercer (c) lavado, respectivamente.

### II.2.iii. Secado del material pretratado

Luego del lavado viene la etapa de secado del material, fase fundamental para la obtención de buenos rendimientos en la etapa de SSF, debido a que estos varían significativamente cuando se utiliza material húmedo <sup>[21]</sup>.

Para esta etapa se utilizó una estufa a 40°C durante la noche por aproximadamente 16 horas.

En la figura II – 3 se pueden observar las placas Petri preparadas para la fase de secado, tanto para el material pretratado con PIL como para el control negativo.



**Figura II-3:** Material preparado para el secado. Pretratamiento con PIL (izquierda) y control negativo (derecha).

## II.2.iv. Sacarificación y fermentación simultáneas

Luego de realizado el pretratamiento, lavado y secado de cada uno de los experimentos antes mencionados, se procede a realizar sacarificaciones y fermentaciones simultáneas (SSF), con el fin de determinar el mejor tiempo dentro de cierto rango previamente definido, y determinar cuál de ellos genera mayor producción de bioetanol.

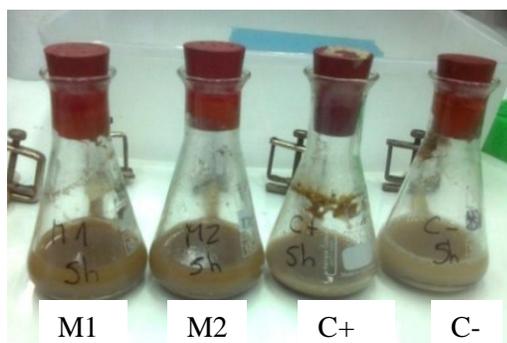
La carga enzimática considerada en este estudio corresponde a:

- Celulasas (Endo y Exoglucanasas): 37 FPU/gr de material.
- Celobiosa ( $\beta$ -glucosidasa): 4,9 CBU/gr de material, volumen determinado según la relación Celulasas/Celobiasas v/v de 7,5:1.

Las condiciones para la SSF fueron determinadas en estudios previos y corresponden a<sup>[21]</sup>:

- Volumen de reacción: 20 ml.
- Carga de inóculo: 10 gr/l de levadura *Saccharomyces cerevisiae* RED STAR
- Temperatura: 40°C.
- Tiempo de reacción: 72 horas.
- Agitación: 250 rpm
- Cargas de material lignocelulósico pre-tratado: 5%,
- Medio de cultivo:
  - Tampón sodio acetato 50 mM, pH = 4,8.
  - Extracto de levadura, 5 g/l.
  - $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g/l.
  - $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,025 g/l.
  - Tween 20, 2,5 g/l.

Para realizar la SSF se debe contar con matraces modificados, previamente esterilizados, y se agrega en ellos la cantidad correspondiente de medio de cultivo, levadura y enzimas, manteniendo las condiciones de esterilidad. Se pesa la cantidad de material pretratado (anexo H) y se agrega a los matraces. El montaje de este sistema se puede observar en la figura II – 4. Finalmente, se dejan los matraces en un agitador rotatorio en las condiciones de operación mencionados anteriormente. Nuevamente, solo la fermentación pretratada con PIL cuenta con duplicado.



**Figura II-4: Montaje del sistema para la SSF. Los dos primeros matraces (M1 y M2) corresponden a material pretratado con PIL. El tercer matraz (C+) corresponde a material pretratado con PIL. El cuarto matraz (C-) corresponde a material sin pretratamiento, todos para 5 horas de pretratamiento (análoga configuración se utiliza para todas las condiciones de pretratamiento).**

Con una jeringa, se toman 1,5 ml de muestra a las 0, 24, 48 y 72 horas de SSF, y se almacenan en tubos Eppendorf. Para desactivar las levaduras y enzimas, se colocan los tubos en un baño de agua a 100 °C por 10 minutos. Luego de ello, se debe centrifugar por 5 minutos a 12.500 rpm, para luego obtener el sobrenadante y almacenarlo congelado para posteriores análisis de azúcares, glucosa y etanol.

## **II.3. Metodologías**

### **II.3.i. Medición de azúcares reductores**

Para la medición de azúcares reductores se utilizó la metodología con Ácido Dinitrosalicílico (DNS). En una placa de 96 pocillos se diluyen 7 µl de muestra en 63 µl de buffer de Acetato de Sodio 50 mM. Se agrega DNS de manera de completar una reacción 1:1. En este caso, se agregaron 70 µl de reactivo. Se deja reaccionar por 10 minutos a 100 °C y se enfría en hielo por 5 minutos para detener la reacción. Se traspasan las muestras a una placa de 96 pocillos desechable que permita ser leída por un espectrofotómetro Anthos modelo 2012, a 550 nm. Para poder realizar la medición es necesario construir una curva de calibración.

### **II.3.ii. Medición de glucosa**

Para la determinación de la concentración de glucosa en cada muestra se utiliza un kit comercial de ensayo Gluc-Pap marca Randox (GL2623), la cual se basa en la enzima glucosa oxidasa. La estimación de la concentración de glucosa se llevó a cabo de la misma manera que fue realizada en estudios previos.

[21]

### **II.3.iii. Medición de etanol**

Para la realización de esta etapa, es necesario centrifugar las muestras a 12.000 rpm (18.514g) por 2 minutos y luego filtrarlas de modo de eliminar restos celulares y otros sólidos. En la medición de etanol se utilizó un cromatógrafo de gases (GC). 0,8 ml de muestra debe ser colocadas en viales de 1 ml y puestas en el plato distribuidor del GC el cual inyecta 1 µl. El GC está conectado a un computador y cuenta con una interfaz que genera un peak, el cual, mediante una curva de calibración, entrega la concentración de etanol en la muestra al medir el área bajo la curva.

### III. Resultados y discusión

Las condiciones de operación utilizadas durante los experimentos se detallan en la Tabla III – 1. Se evaluó el comportamiento del Líquido Iónico Prótico (PIL) en distintas condiciones de operación. Además, se hizo una comparación entre el desempeño del PIL y el Líquido Iónico Aprótico (AIL) bajo las mismas condiciones de pretratamiento y Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF).

En el pretratamiento, se tomó como caso base 110 °C de temperatura y se investigó el desempeño pretratando a 70 °C, de modo de determinar si la disminución en la producción de bioetanol es significativa al reducir la temperatura de pretratamiento.

**Tabla III-1: Parámetros en estudio y rangos de trabajo para el pre-tratamiento y SSF. Agentes de pretratamiento utilizados.**

<b>Condiciones de operación</b>	
<b>Parámetro</b>	<b>Rango</b>
<b>Temperatura de pretratamiento [°C]</b>	70 , 110
<b>Razón biomasa/LI</b>	1/3, 1/6, 1/10
<b>Tiempo de pretratamiento [h]</b>	1, 3, 5
<b>Tiempo de SSF, [h]</b>	0 , 24, 48 72
<b>Agentes de Pretratamiento</b>	
<b>PIL a evaluar</b>	2 - HEAA
<b>Control positivo</b>	[EMIM] [Ac]
<b>Control negativo</b>	Agua destilada

Se analizó el etanol obtenido luego de aplicadas estas condiciones tanto como concentración total obtenida(g/l) y rendimientos porcentuales, como productividad por tiempo de pretratamiento, tiempo de SSF y gramos de Líquido Iónico (LI) utilizado (g/x;  $x = h_{SSF}, h_{pretratamiento}, g$  LI utilizado).En el análisis de resultados se determinó el tiempo de SSF, la temperatura de pretratamiento, el tiempo de pretratamiento y la razón biomasa/LI que entregaron los mejores índices de productividad de etanol.

Para esto, se tomó la variable de estudio (tiempo de SSF, razón biomasa/LI, temperatura y tiempo de pretratamiento) y se fijaron las demás condiciones en el caso base, por lo que pueden existir interacciones en el conjunto de condiciones utilizadas que no hayan sido consideradas en este análisis. Para ello, sería recomendable desarrollar un modelo a partir de diseño factorial, de modo de estudiar el efecto del conjunto de variables en el resultado obtenido.

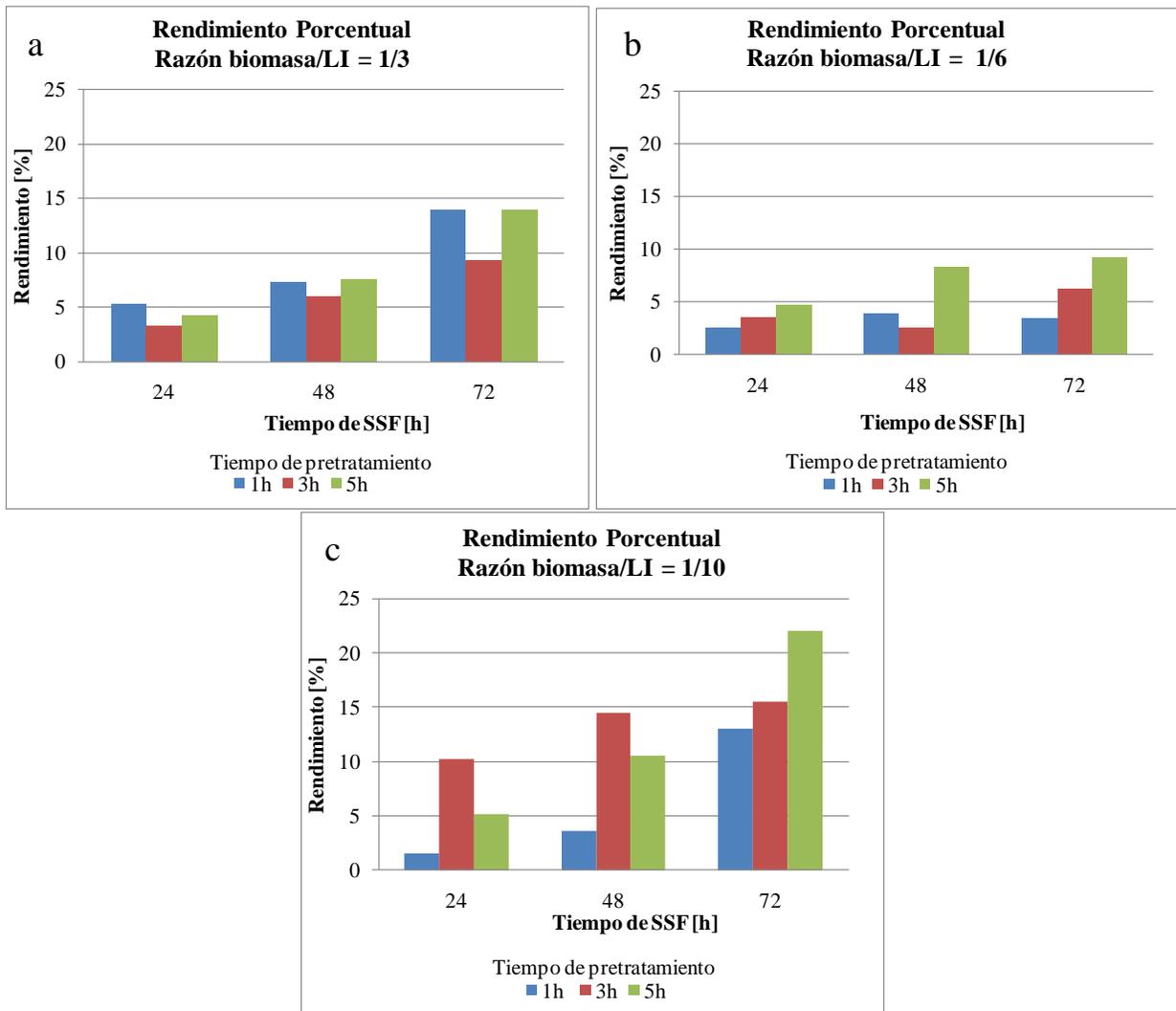
En el anexo D se muestra una tabla con los mejores resultados para cada temperatura y razón de mezcla biomasa/LI, indicando a que tiempo de pretratamiento y a qué tiempo de SSF corresponden, tanto para el PIL, como para el control positivo y para el control negativo.

A continuación, se analizarán los resultados obtenidos según lo expuesto anteriormente.

### III.1. Estudio del efecto del Tiempo de SSF

Para comenzar, se estudió el rendimiento porcentual obtenido en los experimentos, con el objetivo de determinar el tiempo de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) que entregue la mayor cantidad de etanol respecto del etanol potencial. Este se calculó a partir de la totalidad de glucosa presente en la celulosa que está contenida en los residuos de eucalipto. Además, se consideró la diferencia porcentual entre los rendimientos de cada tiempo estudiado, para determinar el tiempo de SSF más adecuado en caso de escalar un proceso de producción de bioetanol.

Se evaluaron muestras obtenidas a las 0, 24, 48 y 72 horas de SSF utilizando material pretratado con PIL a 110 °C (caso base). La Figura III – 1 muestra los rendimientos porcentuales obtenidos para las razones biomasa/LI: 1/3, 1/6 y 1/10, luego de 1, 3 y 5 horas de pretratamiento.



**Figura III-1: Rendimiento porcentual respecto de lo potencial para cada razón biomasa/LI, en base a muestras de SSF con material pretratado a 110°C en las tres razones biomasa/LI y los tres tiempos de pretratamiento mencionados en la figura.**

Se observa que en la mayoría de los casos, a las 24 horas de SSF el rendimiento porcentual no supera el 5%, excepto para el material pretratado por 3 horas a la razón biomasa/LI 1/10 (Figura III – 1.c) que alcanza cerca del 10% de rendimiento. Por otro lado, a las 72 horas de SSF solo en una ocasión se

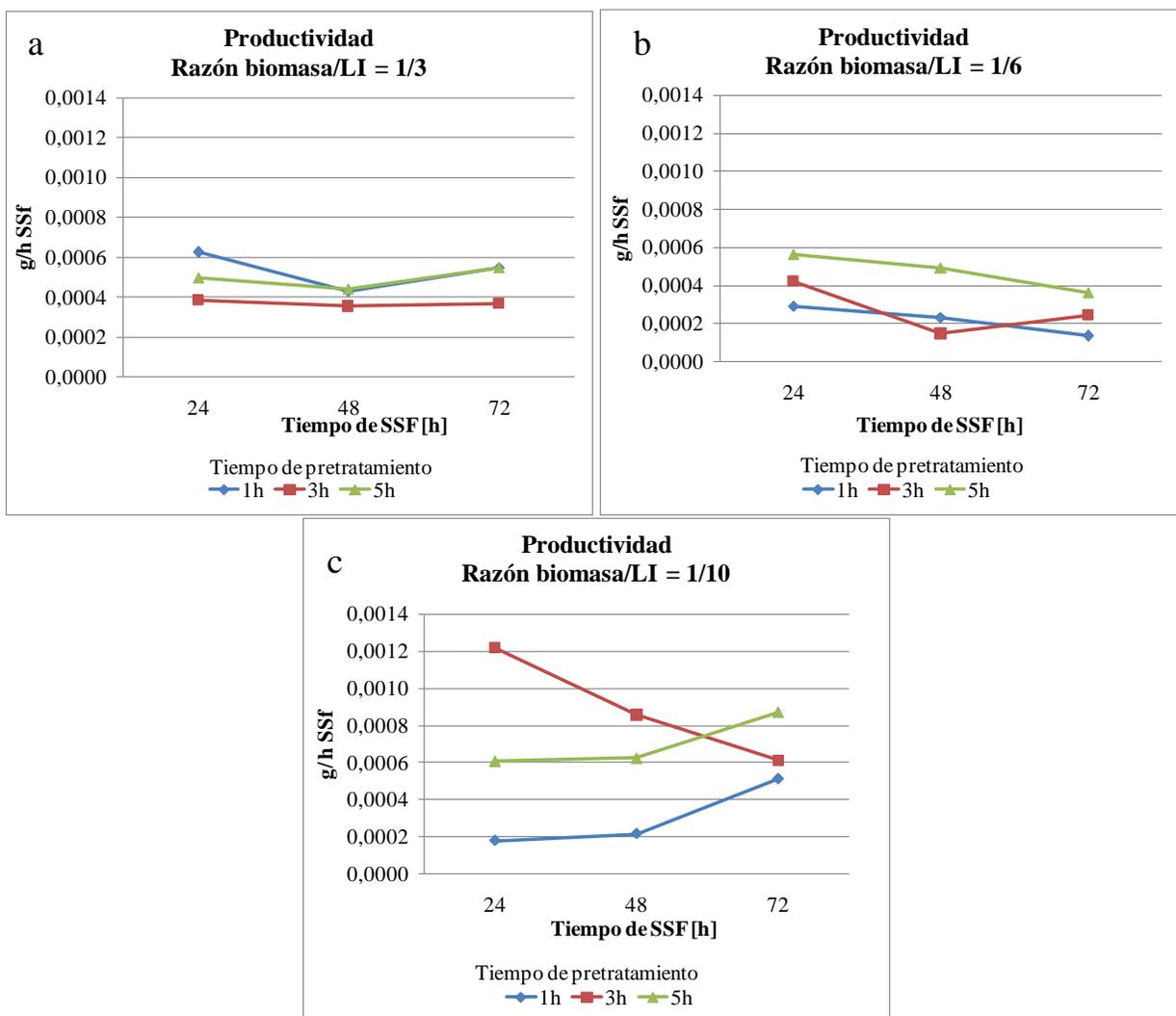
supera el 20% de rendimiento (Figura III – 1.c), estando generalmente entre 10 y 15%, incluso menor. Aun siendo bajo el rendimiento tras un día de SSF, la diferencia entre las 24 y las 72 horas no supera el 10% de rendimiento, por lo que si se diseña un proceso de producción de bioetanol, sería conveniente realizar el proceso cada 24 horas y repetirlo. El efecto del tiempo de pretratamiento y de la razón biomasa/LI en las concentraciones finales de etanol se discutirán más adelante.

Comparativamente con lo mostrado por Oloffson et al. <sup>[46]</sup>, los rendimientos antes mencionados son inferiores a lo producido por otros tipos de pretratamiento. El mayor de ellos es el obtenido en paja de cebada pretratada con explosión de vapor y sacarificada y fermentada a 35 °C, donde el etanol alcanzó un 63% de rendimiento y 22,1 g/l de etanol. Puede que la diferencia radique, además del tipo de pretratamiento, en la temperatura de SSF, ya que se sabe que la temperatura óptima para la *S. cerevisiae* es cercana a los 30 °C <sup>[46]</sup>, a diferencia de los 40 °C utilizados en este estudio.

Complementariamente, para determinar el tiempo de SSF que entrega mayor cantidad de etanol, se determinó la productividad de etanol por hora de SSF (g/h<sub>SSF</sub>). Esto último es importante ya que el proceso de producción (en particular, la SSF) requiere mantener en el tiempo ciertas condiciones de temperatura, lo que consume energía y, a su vez, puede aumentar los costos de producción, disminuyendo su factibilidad económica.

La productividad es un parámetro interesante al momento de diseñar un proceso de producción de bioetanol, ya que a pesar de que la concentración obtenida a las 72 horas de SSF debería ser siempre mayor que tiempos menores, la productividad por hora de SSF indica si el proceso se debe realizar por dichas horas o efectuar procesos más cortos en el mismo intervalo de tiempo.

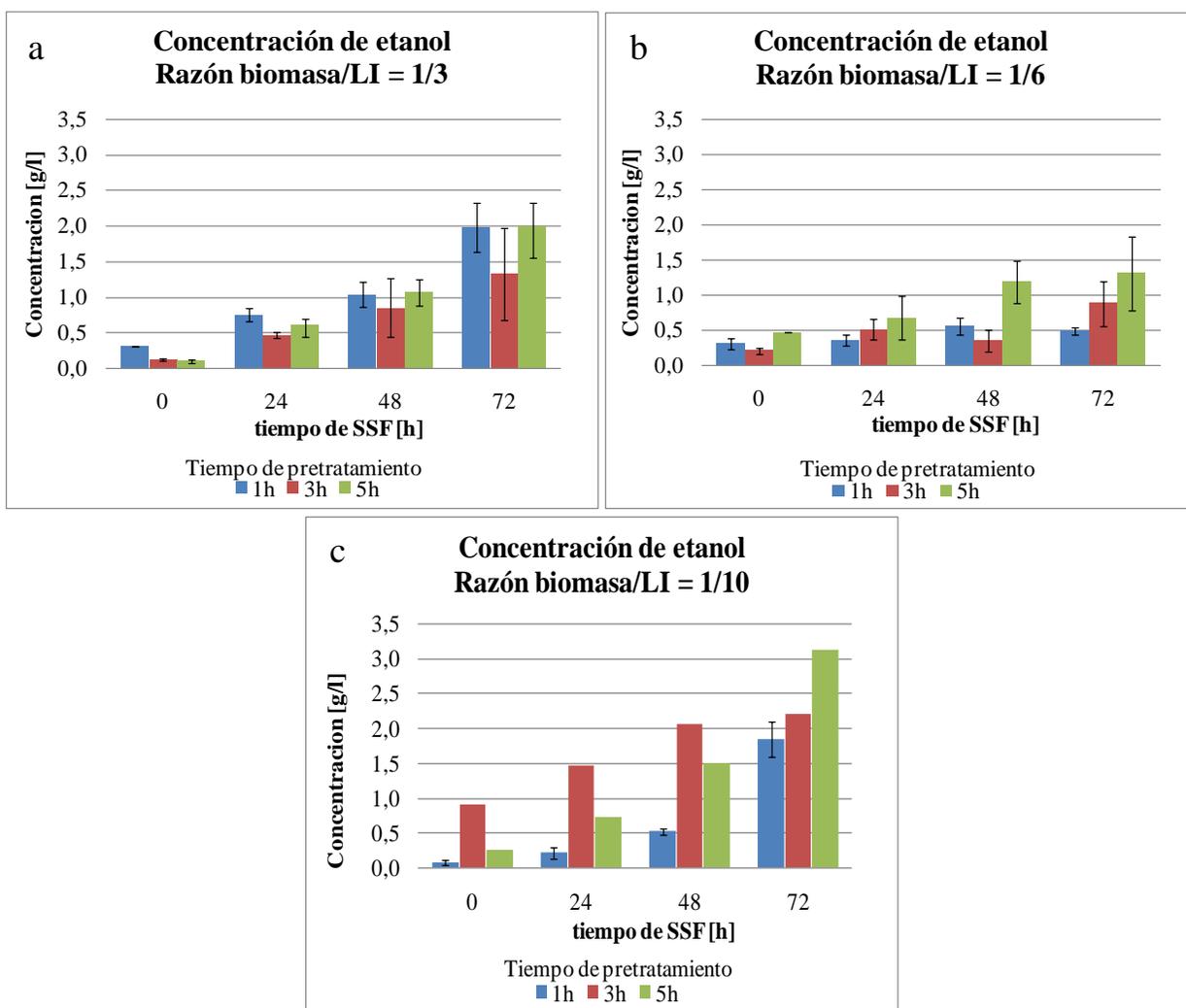
Se evaluaron muestras obtenidas luego de 0, 24, 48 y 72 horas de SSF utilizando material pretratado con PIL a 110 °C. La Figura III – 2 muestra la productividad obtenida para las razones biomasa/LI: 1/3, 1/6 y 1/10 respectivamente, luego de 1, 3 y 5 horas de pretratamiento. Es importante mencionar que no se consideró el tiempo 0 de SSF, ya que solo indica la concentración de etanol que se genera en el pretratamiento, además de hacer imposible el análisis de productividad (se indetermina).



**Figura III-2: Productividad por hora de SSF para cada razón biomasa/LI, en base a muestras de SSF con material pretratado a 110°C en las tres razones biomasa/LI y los tres tiempos de pretratamiento mencionados en la figura.**

En primer lugar, se puede observar que en los tres casos, el máximo global de productividad en cada razón biomasa/LI se encuentra a las 24 horas de SSF (para más detalle de valores máximos, ver anexo D). Por otro lado, en 6 de los 9 casos mostrados en la figura III – 2 la tendencia es decreciente, 2 de ellos se mantienen en sus valores y 2 son crecientes. Con todo lo anterior, se deduce que el tiempo de SSF que entrega mayor concentración de etanol por hora de SSF se encuentra a las 24 horas. A pesar de que es posible encontrar valores máximos productividad a las 72 horas de SSF, estas ocasiones son las mínimas y menores que el máximo global por cada razón biomasa/LI.

Lo anterior se basa en el hecho de que se está midiendo la concentración generada por hora de SSF. La diferencia entre las 0 y 24 horas de SSF es sustancial, debido a que al inicio no existe etanol (o está en concentraciones despreciables) y luego de 24 horas se incrementa notoriamente, como se observa en la figura III – 3. Transcurridas 48 horas de SSF, si bien existe un aumento de la concentración de etanol respecto de las 24 horas, este no es tan significativo como en primer incremento, por lo que el aporte de cada hora de SSF disminuye. Lo mismo sucede con las 72 horas respecto de las 48 horas, donde la contribución de cada hora de SSF es aún menor.



**Figura III-3: Concentraciones obtenidas por día de SSF para cada razón biomasa/LI, en base a muestras de SSF con material pretratado a 110°C en las tres razones biomasa/LI y los tres tiempos de pretratamiento mencionados en la figura. Barras de error indican la desviación estándar de cada muestra.**

La disminución en el incremento de la concentración puede ocurrir ya que transcurrido cierto tiempo de SSF se comienza a agotar la celulosa disponible para hidrolizar, debido al efecto del pretratamiento, lo que agota también los azúcares fermentables y, por ende, el aumento de la concentración de etanol. Para probar lo anterior, se realizaron mediciones de azúcares reductores y de glucosa, los cuales disminuyen al aumentar el tiempo de SSF, como se puede observar en la figura III – 4. Es importante mencionar que si bien la concentración de azúcares reductores no se anula al aumentar el tiempo de SSF, si se ve disminuida con el incremento del tiempo. Caso contrario sucede con la concentración de glucosa, donde esta disminuye notoriamente conforme aumenta el tiempo de SSF.

Con lo anterior, se deduce que los bajos rendimientos en la SSF mencionados en la primera parte de este apartado no se deben a problemas en el proceso de Sacarificación y Fermentación Simultánea, si no que a baja liberación de celulosa en el pretratamiento.

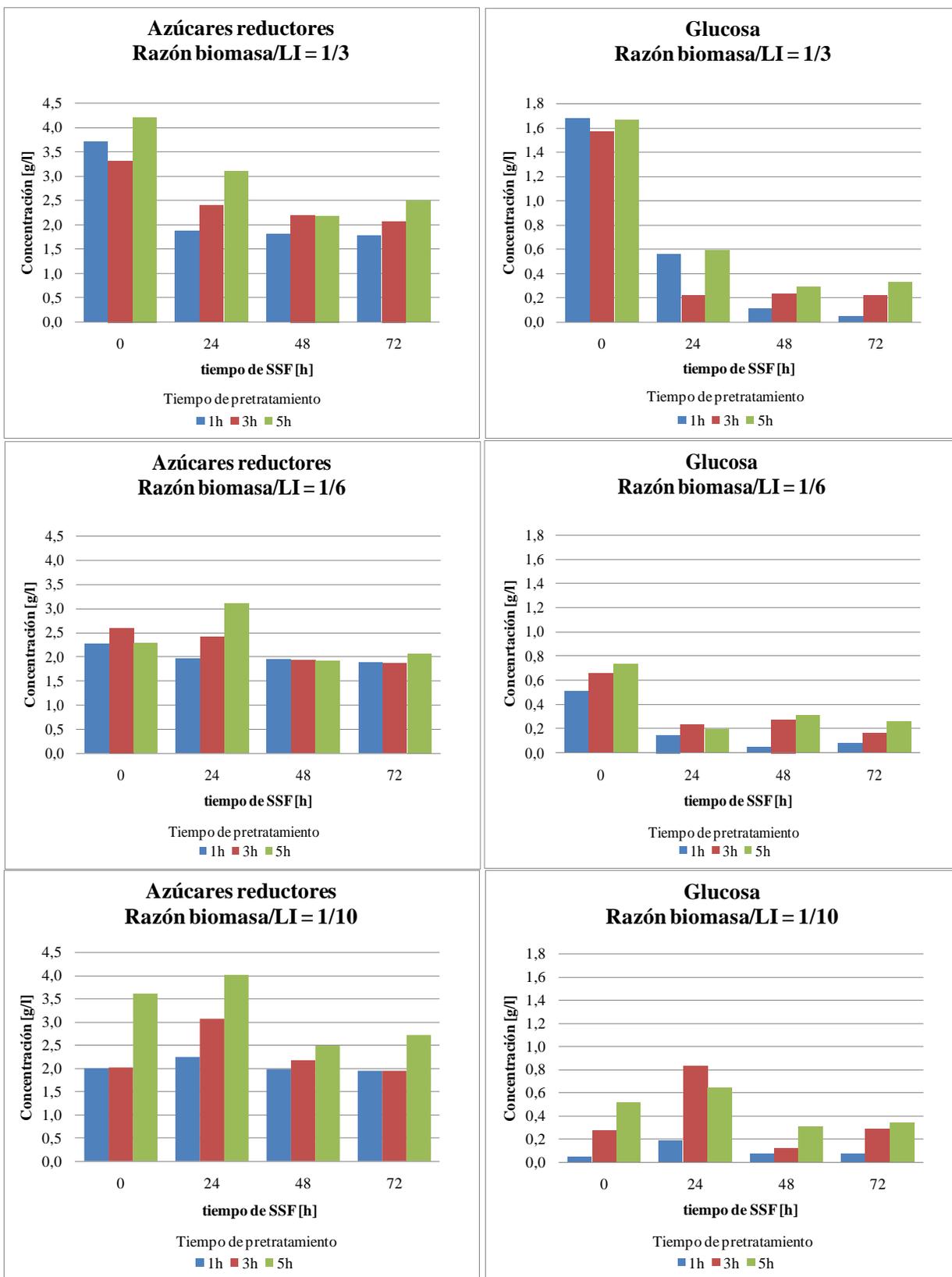


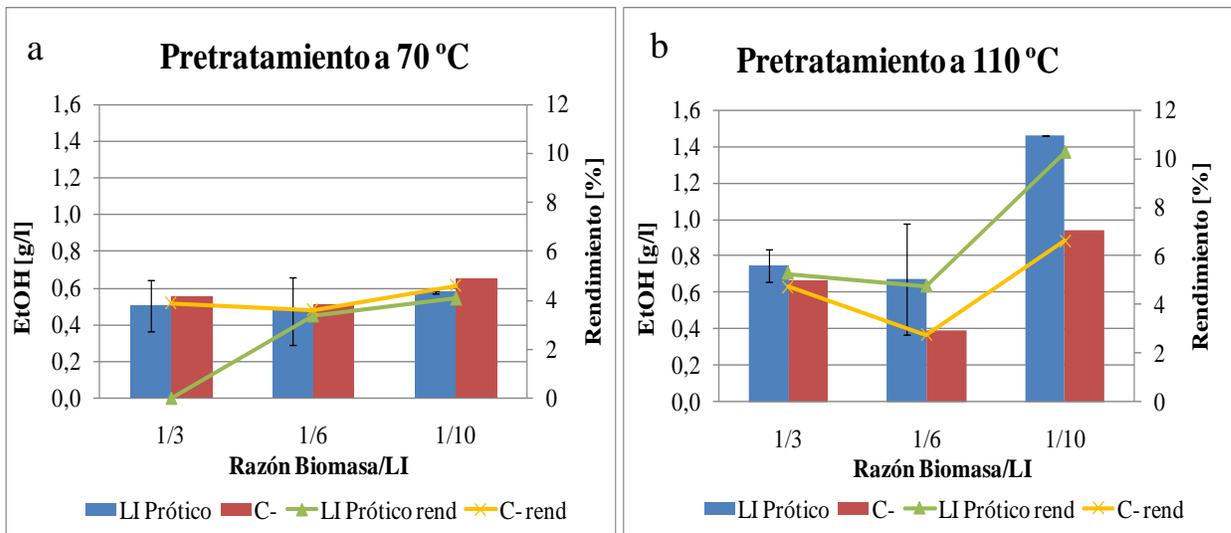
Figura III-4: Concentración de azúcares reductores y glucosa luego de cada día de SSF, en base a muestras de SSF con material pretratado a 110°C en las tres razones biomasa/LI y los tres tiempos de pretratamiento mencionados en la figura.

El análisis del efecto de la cantidad de LI utilizado y de tiempo durante el pretratamiento se analizará en el punto III.3 de este capítulo, por medio de la productividad g/g LI y g/h<sub>pretratamiento</sub>.

Por lo anterior, los siguientes análisis se realizaron en base a los resultados obtenidos para las muestras con 24 horas de SSF. Además, dados estos índices, puede ser recomendable realizar experimentos por menos tiempo de SSF (ej.: 3, 6, 12, 18 horas).

### III.2. Efecto de la Temperatura de pretratamiento

Para estos experimentos se pretrató la biomasa a 70 °C y 110 °C. Para cada temperatura y dados los resultados anteriormente expuestos, se buscaron las máximas concentraciones de etanol y el máximo de rendimiento para las 24 horas de SSF (independientemente del tiempo de pretratamiento) y se compararon entre las distintas temperaturas, como muestra la figura III – 5:



**Figura III-5: Máximas concentraciones (g/l) de etanol (barras, eje izquierdo) y rendimientos porcentuales (líneas, eje derecho) obtenidos para las distintas temperaturas de pretratamiento. Corresponden a máximos valores a partir de material pretratado a 1, 3 y 5 horas con PIL, no necesariamente en orden. El control negativo (C-) corresponde a las concentraciones de etanol obtenidas a partir de material sin pretratamiento. Barras de error indican la desviación estándar de cada muestra.**

En primer lugar, se observa que tanto para el material pretratado con PIL como para el material sin pretratar, las concentraciones y los rendimientos porcentuales obtenidos son mejores para 110 °C (Figura III – 5.b) que para 70 °C (Figura III – 5.a).

Por otro lado, para el material pretratado con PIL a 110 °C, tanto las concentraciones de etanol como los rendimientos porcentuales son superiores que los obtenidos en el material sin pretratamiento. Caso contrario sucede en los resultados con pretratamiento a 70 °C, donde el material sin pretratar genera mejores resultados que el material pretratado con PIL para las tres razones biomasa/LI. Sin embargo, la desviación estándar de los resultados es alta, sobre todo para las muestras obtenidas con razón biomasa/LI de 1/6 en ambas temperaturas, por lo que la precisión de los valores encontrados es baja y pueden ser no representativos.

Lo anterior es análogo a lo observado en estudios previos de material pretratado con [EMIM] [Ac]. Sang et al. indicó que el incremento en la temperatura de pretratamiento genera un aumento en la pérdida de cristalinidad de la biomasa pretratada con este AIL<sup>[40]</sup>. Similar comportamiento puede tener el 2 – HEAA con el incremento de la temperatura, disminuyendo más fácilmente la cristalinidad de la biomasa, liberando celulosa y haciendo más fácil el acceso de las enzimas en la etapa de hidrólisis enzimática.

Los resultados expuestos coinciden con lo esperado. Como se indica en el estudio de L. Martínez<sup>[21]</sup>, el material pretratado a 70 °C por 30 y 60 minutos genera rendimientos muy bajos en la sacarificación, incluso menores que el material sin pretratamiento, alcanzando rendimientos del 2%. Como ahí se indica, esto se puede deber a que el anión acetato interactúa con la lignina sólo a mayores temperaturas de operación o porque el catión 2-hidroxietilamonio no es capaz de interactuar con la celulosa, por lo que ésta se mantuvo cristalina a 70°C. Por ello, resulta interesante estudiar la misma temperatura con mayores tiempos, de modo de determinar si al dejar la biomasa en contacto con el LI durante más tiempo, las concentraciones obtenidas son similares a los resultados obtenidos a 110 °C.

Según lo anterior, se determina que 70 °C es una temperatura ineficiente para pretratar la madera, ya que en ningún caso se supera el 5% de rendimiento, y las concentraciones de etanol obtenidas son bajas (menor al material sin pretratar).

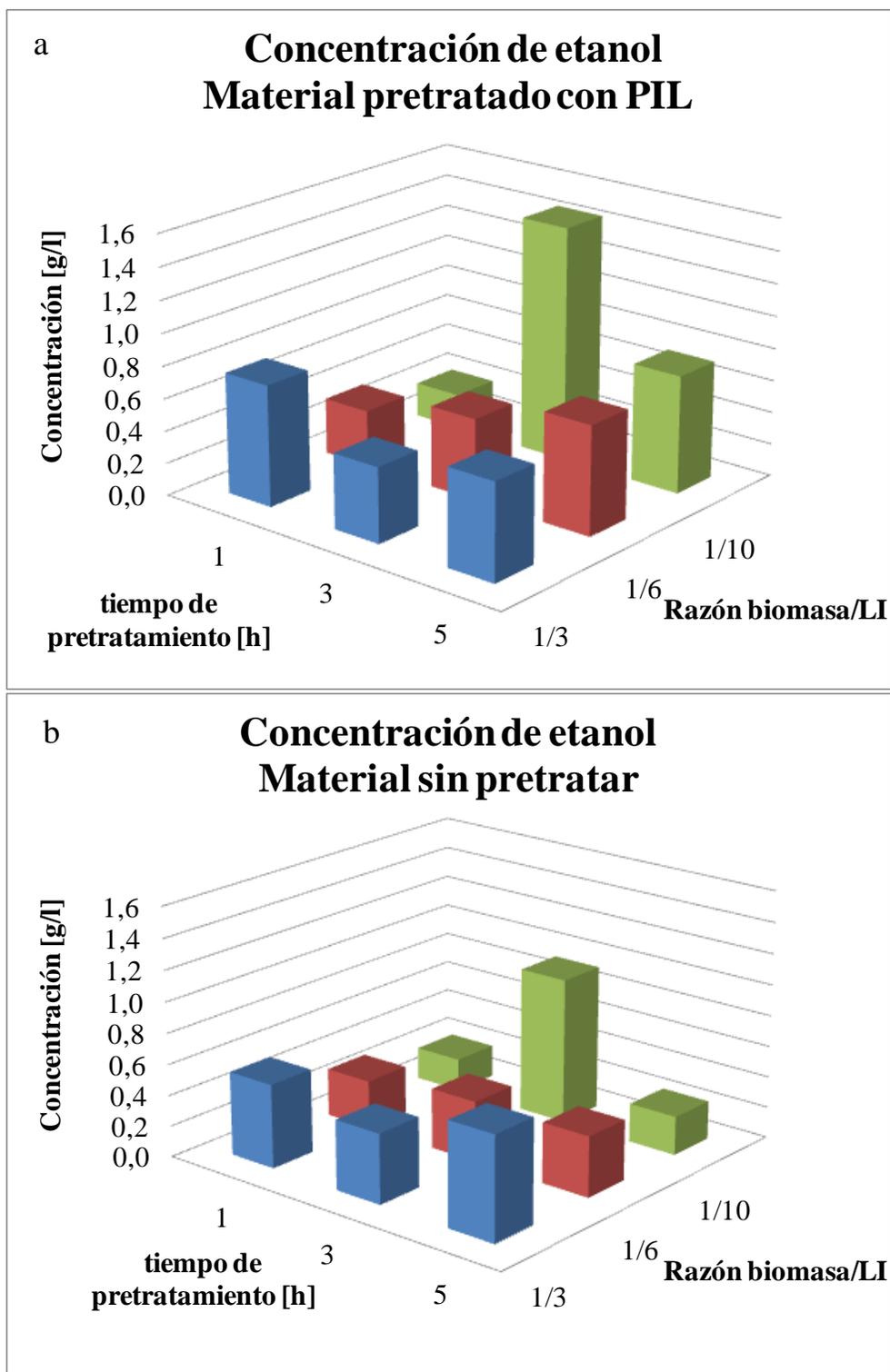
En el estudio de L. Martínez<sup>[21]</sup> al pretratar el material por 30 y 60 minutos a 70°C, se obtuvieron rendimientos porcentuales cercanos a 2%. Comparativamente, si se aumenta el tiempo de pretratamiento a 3 o 5 horas los rendimientos aumentaron hasta un 5% (Figura III – 5.a), por lo que se obtuvo un incremento de los rendimientos a 70 °C de cerca de un 3%. Lo anterior, significa que a pesar del aumento del tiempo en el pretratamiento, no hubo un incremento significativo en la producción de bioetanol pretratando a 70 °C por más tiempo.

Aun siendo los rendimientos inferiores al 12%, el material pretratado a 110 °C genera mayor concentración de etanol que el material sin pretratamiento a la misma temperatura, por lo que es una temperatura eficiente si se requiere aumentar la concentración obtenida de bioetanol. Este rendimiento equivale a generar 37 l EtOH/ton de material pretratado con PIL.

Es recomendable estudiar mayores temperaturas de pretratamiento con mayores razones biomasa/LI, para comprobar si un aumento de la cantidad de LI en conjunto con mayor temperatura puede generar mayor cantidad de etanol. Estas temperaturas no pueden superar los 130 °C, ya que mayores temperaturas de pretratamiento pueden degradar el PIL según datos de la literatura<sup>[48]</sup>.

### **III.3. Efecto del tiempo y de la razón biomasa/LI en el pretratamiento.**

Para el siguiente análisis se compararon los resultados obtenidos a partir de SSF por 24 horas con material pretratado durante 1, 3 y 5 horas con razones biomasa/LI de 1/3, 1/6 y 1/10 (en p/p), en base a 1 gramo de biomasa húmeda. En la Figura III – 6 se muestran los resultados de las concentraciones obtenidas luego de los tres tiempos de pretratamiento en las razones biomasa/LI establecidas.



**Figura III-6:** Concentración de etanol luego de 24 horas de SSF utilizando material pretratado a 110 °C en los tiempos y razones biomasa/LI correspondientes. La figura a. muestra la concentración para material pretratado con PIL. La figura b. muestra la concentración utilizando material si pretratar (control negativo).

En primer lugar, es posible ver que en la mayoría de los casos, el material pretratado con PIL genera mayor cantidad de etanol que el material sin pretratamiento (control negativo). Esto solo no se cumple para el material pretratado por 5 horas con una razón biomasa/LI de 1/3 (Figura III – 6). Lo

anterior cumple con lo esperado, ya que las condiciones elegidas para evaluar los resultados (24 h de SSF y 110 °C), deberían generar mayores concentraciones de etanol para el material pretratado con PIL que para el material sin pretratar (control negativo), según lo observado en las secciones anteriores de este capítulo.

A pesar de no tener la concentración más alta de etanol, la mayor diferencia porcentual entre el material pretratado con PIL y el control negativo se dio para las 5 horas de pretratamiento en la razón 1/10 (Figura III – 6), siendo un 192% superior el PIL frente al material sin pretratamiento.

Las diferencias porcentuales entre lo producido por el material sin pretratamiento y el pretratado con PIL se ven en la Tabla III – 2. Estos porcentajes indican cuán superior es la concentración de etanol utilizando material pretratado con PIL que utilizando material sin pretratar.

**Tabla III-2: Diferencias porcentuales<sup>f</sup> entre las concentraciones obtenidas con el material sin pretratamiento y material pretratado con PIL a 110 °C en cada tiempo de pretratamiento y para cada razón biomasa/LI.**

Razón biomasa/LI	Tiempo de pretratamiento [h]		
	1	3	5
1/3	18%	3%	-10%
1/6	13%	30%	70%
1/10	2%	55%	192%

Respecto de las diferencias porcentuales entre las concentraciones de etanol mostradas en la Tabla III – 2, se puede observar que las diferencias entre lo producido por el material sin pretratar y el material pretratado con PIL en las razones biomasa/LI de 1/6 y 1/10 son crecientes con el tiempo de pretratamiento. Lo anterior concuerda con lo esperado, ya que mayores tiempos de pretratamiento deberían generar mayores concentraciones de etanol.

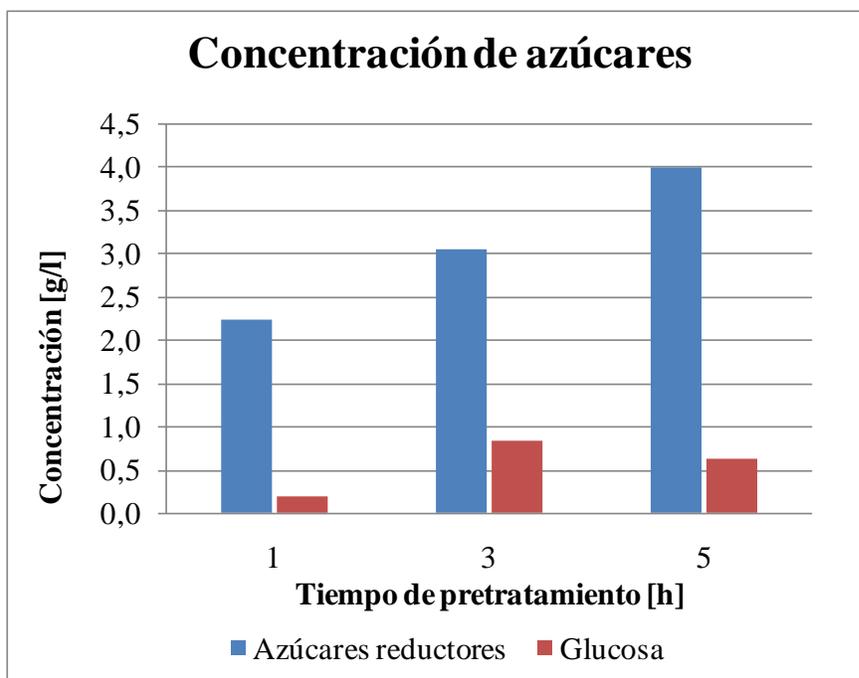
En cuanto al comportamiento observado para la razón 1/3, las diferencias porcentuales disminuyen con el tiempo, llegando incluso a ser negativo (debido a que el material sin pretratar generó más etanol que el material pretratado con PIL). En este caso, la razón pequeña de biomasa/LI puede generar problemas en la interacción biomasa – LI, debido a que existirían problemas de transferencia de masa al ser poca la cantidad de PIL. Al aumentar el tiempo de pretratamiento, puede que el LI no degrade la lignina de la biomasa si no que comience a degradar la celulosa a glucosa, la que posteriormente queda disuelta durante el lavado y se elimina al separar el sobrenadante.

Respecto de la concentración de etanol en cada razón biomasa/LI, no se cumple ningún patrón de comportamiento estándar al aumentar el tiempo de pretratamiento (Figura III – 6.a). Se esperaría que los resultados fuesen similares a lo que ocurre en la razón 1/6, ya que a mayor tiempo de pretratamiento debería haber mayor liberación de celulosa, a la vez de mayor cantidad de azúcares fermentables y por último, mayor generación de etanol.

La mejor concentración de etanol para material pretratado con PIL se dio para la razón 1/10 con 3 horas de pretratamiento (Figura III – 6.a), y no para 5 horas, como era de esperar. En la Figura III - 7 se observa las concentraciones de azúcares reductores y glucosa para 1, 3 y 5 horas de pretratamiento con la razón 1/10. Se observa que si bien los azúcares reductores aumentan conforme lo hace el tiempo de pretratamiento, la cantidad de glucosa a las 3 horas de pretratamiento es mayor que la cantidad a las 5

<sup>f</sup>Cálculo de diferencias porcentuales en anexo F.b.6

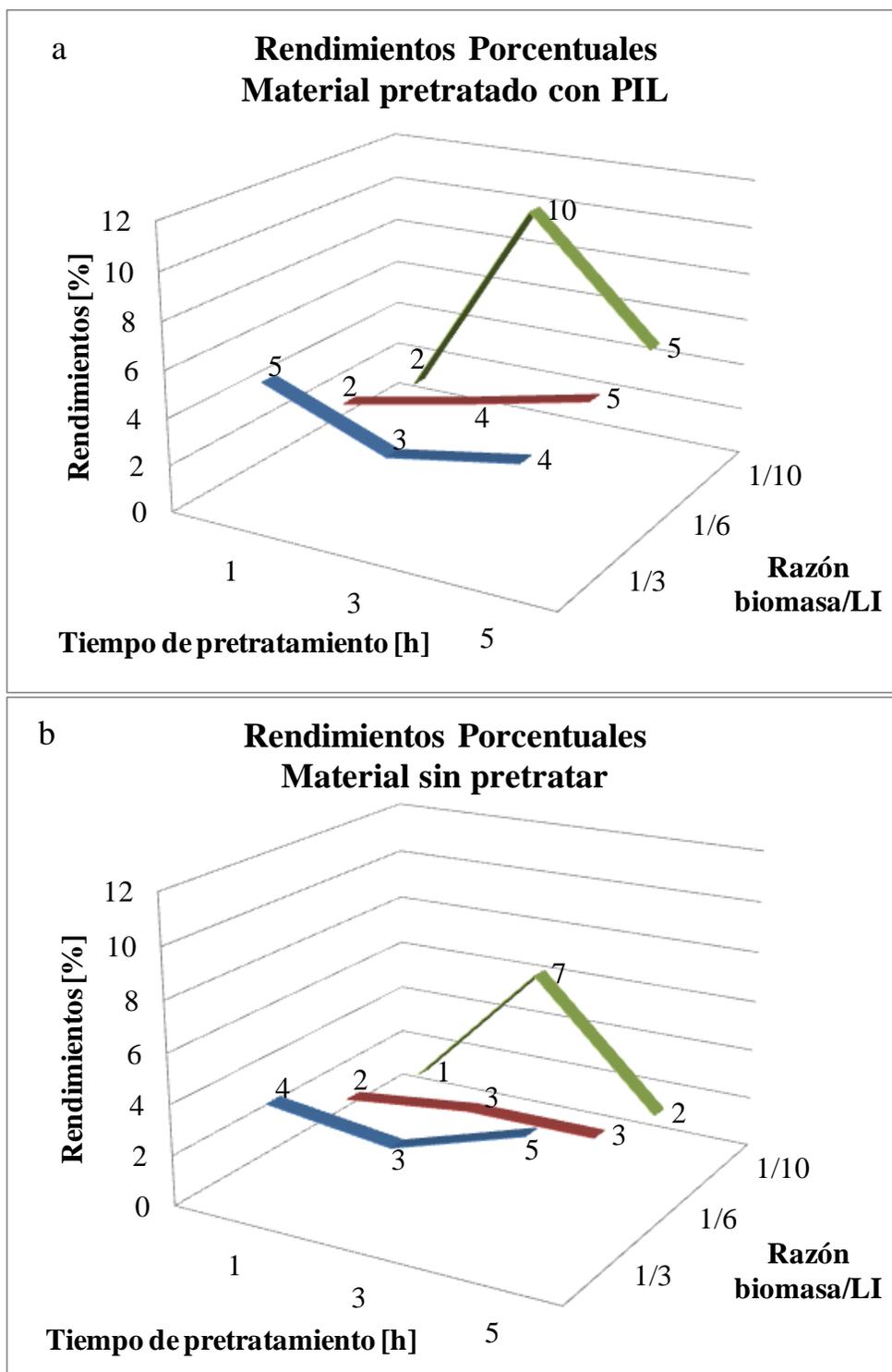
horas. Este comportamiento puede deberse a que 5 horas de pretratamiento pueden generar una degradación de la celulosa a glucosa y pérdida de ésta durante el lavado, como fue explicado anteriormente. Es por esto que sería recomendable probar con 3 y 5 horas de pretratamiento con otras razones biomasa/LI (tanto mayores y menores), de modo de corroborar en qué conjunto de condiciones la celulosa se comienza a degradar.



**Figura III-7: Concentración de azúcares reductores y glucosa luego de 24 horas de SSF utilizando material pretratado con PIL en razón biomasa/LI de 1/10 durante los tres tiempos de pretratamiento mencionados en el gráfico.**

Por otro lado, como se observa en la Figura III – 6.a, las concentraciones de etanol para el material pretratado con PIL durante 1h, disminuyen al aumentar la razón biomasa/LI. Este resultado no concuerda con lo esperado, ya que independiente del tiempo de pretratamiento, la concentración de etanol obtenida debería aumentar conforme se incrementa la cantidad de LI utilizado. Contrariamente, es posible observar un aumento de la concentración de etanol al aumentar la razón biomasa/LI si la biomasa es pretratada durante 3 y 5 horas, ya que en ambos casos, al aumentar la cantidad de LI utilizado, aumenta también la cantidad de etanol generada. Este aumento se observa significativamente en el material pretratado por 3 horas con razón 1/10 respecto de la razón 1/6, siendo un 73% superior.

En la Figura III - 8 se muestra los resultados de los rendimientos porcentuales obtenidos para cada hora de pretratamiento, respecto de cada una de las tres razones biomasa/LI pretratando a 110 °C, tanto para lo obtenido a partir de material pretratado con PIL como el material sin pretratar.



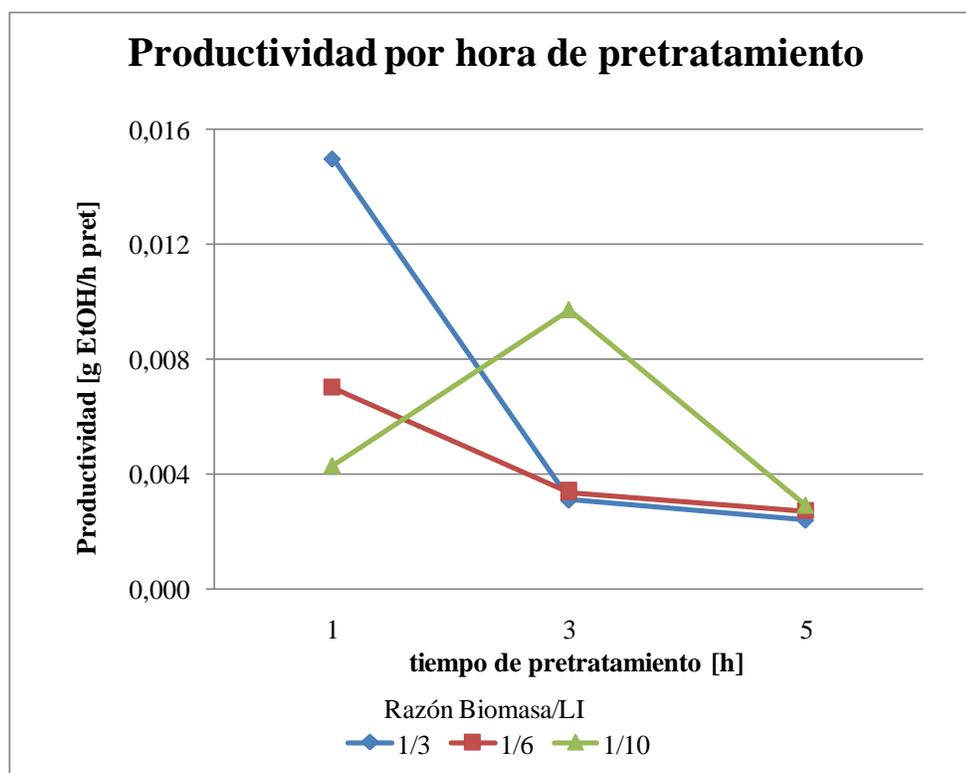
**Figura III-8: Rendimientos porcentuales de etanol luego de 24 horas de SSF utilizando material pretratado a 110 °C en los tiempos y razones biomasa/LI correspondientes. La figura a. muestra los rendimientos porcentuales para material pretratado con PIL. La figura b. muestra los rendimientos porcentuales utilizando material si pretratar (control negativo).**

Se puede observar en la Figura III – 8.a que el mayor de los rendimientos porcentuales se obtuvo para las 3 horas de pretratamiento con razón biomasa/LI de 1/10, alcanzando el cerca del 10%. Cabe destacar que las demás configuraciones no superan el 6% de rendimiento porcentual. Se puede observar

además que los rendimientos porcentuales no siguen ningún patrón en función del aumento de la cantidad de LI. Se esperaría que los rendimientos se incrementen al aumentar la cantidad de LI, tal como sucede en el caso del material pretratado durante tres horas (Figura III – 8.a). Sin embargo, para el material pretratado durante 1 h, el aumento de LI significó un descenso en el rendimiento obtenido, tanto para el material pretratado con PIL como para el material sin pretratar. Más aun, al pretratar la biomasa con la razón biomasa/LI de 1/6 por 1h, el rendimiento es el mismo que tiene el material sin pretratar (2%).

En cuanto al pretratamiento por 5 h (Figura III – 8.a), al aumentar la cantidad de LI el rendimiento porcentual aumenta, al contrario del material sin pretratamiento que disminuye su rendimiento porcentual. Cabe mencionar que el control negativo sirve como referencia en los resultados de rendimiento solo para el tiempo de pretratamiento y no para la razón biomasa/LI, ya que no cuenta con ningún tipo de solvente de material lignocelulósico (material sin pretratamiento).

Posteriormente, para determinar el mejor tiempo de pretratamiento, se calculó la productividad por hora de pretratamiento ( $\text{g/h}_{\text{pretratamiento}}$ ), de modo de determinar qué tiempo genera la mayor cantidad de etanol por hora de pretratamiento. Se evaluaron muestras obtenidas luego de 24 horas de SSF, para material pretratado durante 1, 3 y 5 horas a 110 °C de temperatura con razón biomasa/LI de 1/3, 1/6 y 1/10.



**Figura III-9: Productividad de etanol por hora de pretratamiento ( $\text{g/h}_{\text{pretratamiento}}$ ) obtenidos para material pretratado a 110°C por el tiempo y las razones biomasa/LI que se indican, y luego de 24 horas de SSF.**

Se puede observar en la Figura III - 9 que para las razones biomasa/LI 1/3 y 1/6, la productividad  $\text{g EtOH/h}_{\text{pretratamiento}}$  decrece en función del aumento del tiempo de pretratamiento. A pesar que la concentración obtenida al pretratar en razón 1/3 es baja en todos los tiempos de pretratamiento (Figura III – 6.a), se observa que la tendencia de la productividad es a disminuir en función del tiempo. Lo mismo sucede con los resultados para la razón 1/6, donde la productividad cae al aumentar el tiempo de

pretratamiento. Lo anterior cumple con lo esperado, debido a que las concentraciones de etanol obtenidas luego de pretratar por 3 y 5 horas debían incrementarse con el aumento del tiempo de pretratamiento, lo que no sucedió (Figura III – 6.a). En cuanto a la razón 1/10, el comportamiento del parámetro  $g \text{ EtOH}/h_{\text{pretratamiento}}$  no cumple con la tendencia anterior, debido al importante crecimiento en la concentración a las 3 horas de pretratamiento y la caída en las 5 horas explicado anteriormente.

En la Tabla III – 3 se encuentran los valores máximos, la concentración alcanzada para tal valor y el tiempo de pretratamiento aplicado a la muestra.

**Tabla III-3: Valores máximos obtenidos para el rendimiento  $g \text{ EtOH}/h_{\text{pretratamiento}}$  y su correspondiente concentración de etanol y tiempo de pretratamiento.**

<b>Razón biomasa/LI</b>	<b>Tiempo de pretratamiento [h]</b>	<b>Máximo productividad [g EtOH/h<sub>pretratamiento</sub>]</b>	<b>Concentración [g/l]</b>	<b>Rendimiento [l EtOH/ton de material pretratado]</b>
<b>1/3</b>	1	0,015	0,75	19
<b>1/6</b>	1	0,007	0,35	8,9
<b>1/10</b>	3	0,010	1,5	37

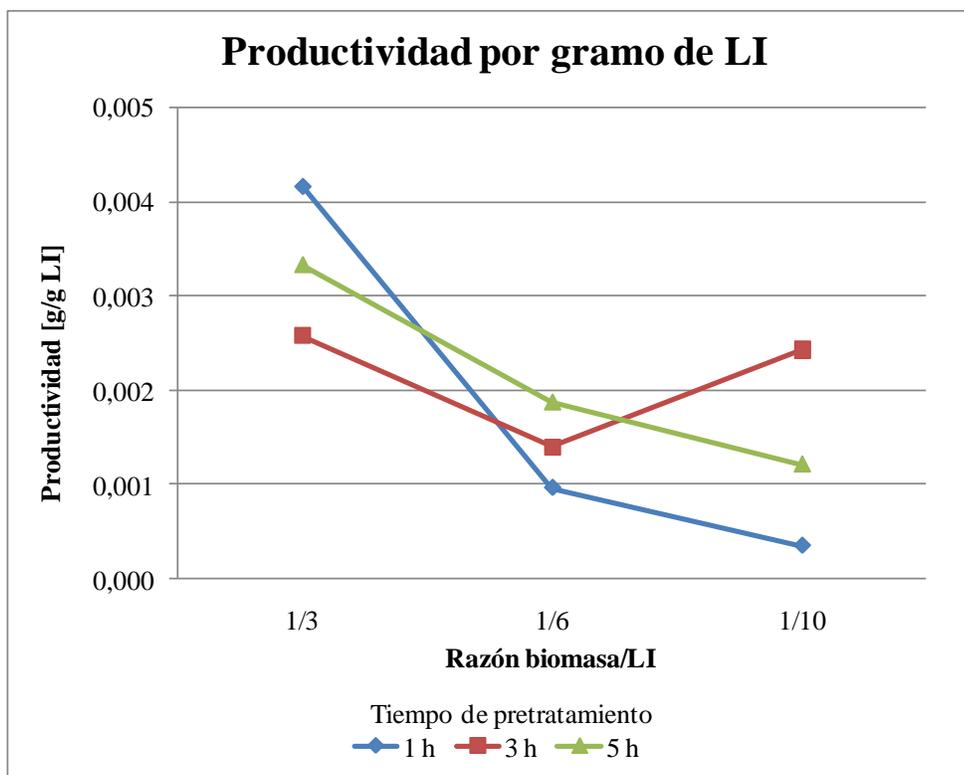
Es posible ver que el máximo global se produce para la razón biomasa/LI de 1/3 luego de 1 hora de pretratamiento. Coincidentemente, en el caso de la razón 1/6 el valor más alto también se obtiene luego de 1 hora de pretratamiento. Distinto es el caso de la razón 1/10 donde su máxima productividad se obtiene luego de 3 horas de pretratamiento.

Los valores de la Tabla III – 3 muestran que no se justifica pretratar la biomasa por más de 1 hora, si se considera la repetitividad del proceso. Esto ya que si bien la cantidad de etanol obtenida con más tiempo de pretratamiento es mayor, aumentar el tiempo de pretratamiento puede generar mayores costos energéticos (debido a que se debe mantener la temperatura a 110 °C), costos que no se compensan con la cantidad de etanol generado por hora. Por ejemplo, dados los valores por hora mencionados, en 3 horas se podría procesar 0,045 g de etanol para la razón biomasa/LI de 1/3, superior a lo obtenido con 3 horas de pretratamiento en razón 1/10 (0,03 g de etanol).

En el caso del tiempo de pretratamiento, es interesante estudiar los litros de etanol generados por tonelada de material pretratado, mostrados en la Tabla III – 3. Como se puede observar, estos rendimientos son muy bajos respecto a lo obtenido al pretratar la biomasa con AIL, que, según lo obtenido por L. Martínez<sup>[21]</sup>, puede llegar cerca de los 360 l EtOH/ton de material seco pretratado.

Por lo tanto, el tiempo recomendado para pretratar la biomasa con el PIL a 110 °C es de 1 hora, debido a que las mayores productividades por hora de pretratamiento se obtuvieron luego de pretratar durante 1 hora, como se observó en la Tabla III – 3.

Finalmente, para determinar la mejor razón biomasa/LI, se estableció la productividad  $g \text{ EtOH}/g \text{ LI}$ , de modo de determinar qué cantidad de LI genera la mayor concentración de etanol. Se evaluaron muestras obtenidas luego de 24 horas de SSF, para material pretratado durante 1, 3 y 5 horas a 110 °C de temperatura con razón biomasa/LI de 1/3, 1/6 y 1/10. La Figura III – 10 muestra los resultados para la productividad por gramo de LI utilizado.



**Figura III-10: Productividad de etanol por gramo de LI utilizado (g/g LI) obtenidos para material pretratado a 110°C por el tiempo y las razones biomasa/LI que se indican, y luego de 24 horas de SSF.**

En cuanto a la productividad de etanol por gramo de LI utilizado (g/g LI), como se puede ver en la Figura III – 10 los valores máximos se encuentran en la razón biomasa/LI de 1/3 para los tres tiempos de pretratamiento, alcanzando valores de 0,0042, 0,0033 y 0,0026 g EtOH/g LI, para 1 h, 3 h y 5 h de pretratamiento, respectivamente.

Para el material pretratado por 1 h y 5 h, el aumento de la cantidad de LI utilizado hace que la curva de productividad sea decreciente. Distinto sucede en el caso del material pretratado durante 3 horas, que para la razón 1/10 vuelve aumentar su productividad, alcanzando cerca de 0,0024g EtOH/g LI, similar al máximo de productividad obtenido para la razón 1/3 pretratada por 1 horas. Ciertamente, es más conveniente realizar el pretratamiento por menos tiempo si las productividades son similares.

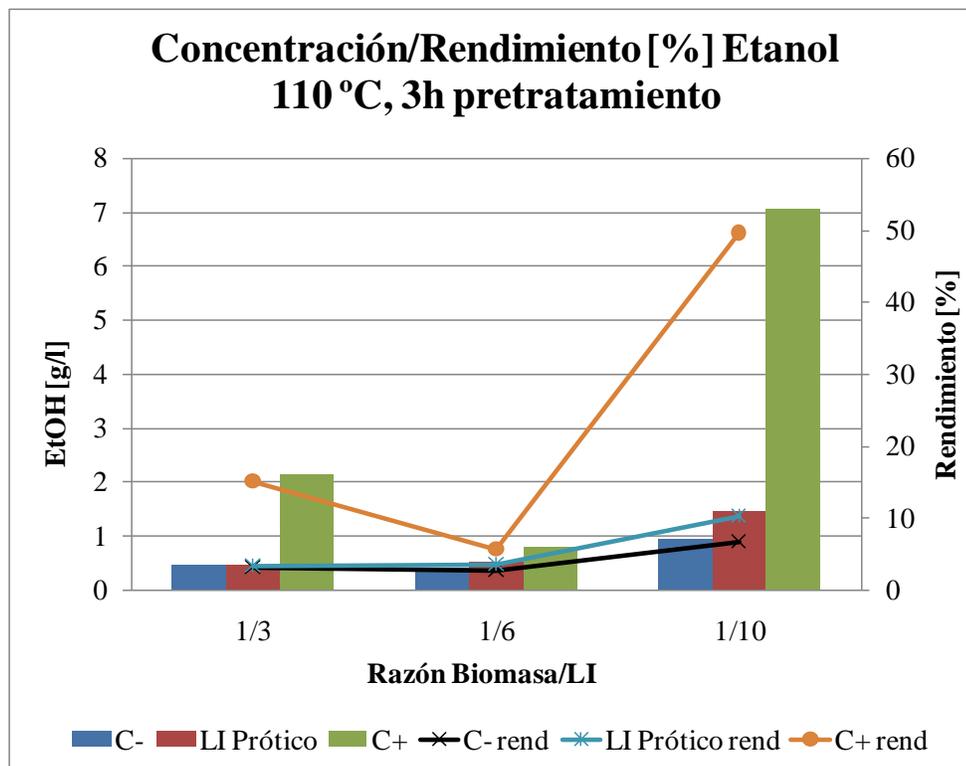
Para este parámetro y según los valores máximos antes mencionados, los litros de etanol generados por tonelada de material pretratado con PIL para la razón biomasa/LI de 1/3 corresponden a 19, 11,8 y 15,2 l EtOH/ton de material pretratado durante 1, 3 y 5 horas, respectivamente.

Según lo anterior, la razón biomasa/LI recomendada para realizar un proceso de producción de bioetanol de segunda generación es de 1/3 (en p/p). Esto coincide con lo reportado en trabajos anteriores [25].

En el anexo E se encuentran las tablas con los resultados generales para cada conjunto de condiciones evaluadas.

### III.4. Comparación entre los pretratamientos con PIL y AIL

En este caso, se comparó el comportamiento del AIL (C+ [EMIM] [Ac]) para 110 °C y 3 horas de pretratamiento para las 3 razones biomasa/LI, luego de 24 horas de SSF. Los resultados de concentración de etanol y rendimiento porcentual respecto de lo potencial se muestran en la Figura III – 10:



**Figura III-11: Concentración (barras, eje izquierdo) y rendimiento porcentual (líneas, eje derecho) para EtOH en distintas razones biomasa/LI aplicadas en el pretratamiento, luego de 24 horas de SSF. El control negativo (C-) corresponde a los resultados en la concentración de etanol aplicando material sin pretratamiento. El control positivo (C+) corresponde a los resultados en la concentración de etanol aplicando material pretratado con Líquido Iónico Aprótico (AIL) [EMIM] [Ac].**

Se puede observar en la Figura III – 10 que la concentración alcanzada por el control positivo llegó hasta los 7 g/l, logrando un 50% de rendimiento porcentual. Comparativamente con lo obtenido por L. Martínez <sup>[21]</sup>, se obtuvo un rendimiento similar al sacarificar la biomasa por 60 minutos con razón biomasa/LI de 1/3, llegando también al 50%. Así mismo, en el estudio de Nazife et al <sup>[29]</sup> se obtuvo que el rendimiento de la sacarificación alcanzó el 65% luego de 72 horas. Si bien el rendimiento obtenido en este caso para el [EMIM] [Ac] fue menor que lo reportado en la literatura, 50% de rendimiento sigue siendo un valor alto respecto a otros AILs utilizados en los pretratamientos. Tal es el caso del [EMIM] [Cl] donde en el estudio de L. Martínez se obtuvo un rendimiento de sacarificación de 5,5% y en el caso de Nazife et al. éste alcanzó un 26%.

También se observa en la Figura III – 10 que la concentración de etanol para pretratamiento con AIL fue siempre mejor que el resultado para pretratamiento con PIL<sup>s</sup>, siendo superior el AIL en un 358% para la razón biomasa/LI de 1/3, 58% superior para la razón 1/6 y 382% superior para la razón 1/10. Aquí se puede ver que las diferencias porcentuales para las razones 1/3 y 1/10 son prácticamente iguales

<sup>s</sup>Cálculo de diferencias porcentuales en el anexo F.b.6.

(358% y 382% respectivamente), lo que significa que a pesar de que se agregue mas LI, la diferencia entre el etanol producido por el PIL y el AIL cumplirá con una relación directa (la diferencia sería constante).

Era de esperar que la mayor diferencia porcentual se encontrara en la razón 1/10, debido a que al haber mayor cantidad de LI, existe mayor interacción entre la matriz lignocelulósica y los iones del LI, lo que produciría mayor rompimiento de la lignina y liberación de celulosa. Con el resultado obtenido se muestra que el nivel de interacción aumenta de igual manera para los dos LI al aumentar la cantidad utilizada en el pretratamiento.

Por otro lado, si se compara la concentración mostrada en la Figura III – 10 para cada razón biomasa/LI, se observa que el AIL en la razón 1/3 genera cerca de un 70% menos etanol que la razón 1/10, como era de esperar. En este sentido sería recomendable estudiar la factibilidad económica de un proceso de producción con ambas cargas de LI para determinar si la superioridad en generación de etanol de la razón 1/10 compensa el costo de utilizar tal cantidad de LI.

Respecto al material sin pretratar (control negativo, (C-) Figura III – 10), las diferencias porcentuales entre las concentraciones de etanol muestran que la generación al utilizar biomasa pretratada con AIL es mucho mejor que al utilizar biomasa sin pretratar, siendo superior el pretratamiento con AIL para la razón biomasa/LI de 1/3 en un 373% que el material sin pretratar, 105% superior para la razón 1/6 y 649% superior para la razón 1/10. En el caso del PIL, las diferencias porcentuales entre las concentraciones muestran que el material pretratado con PIL en razón 1/3 es en un 3% mejor que el material sin pretratar, 29% en el caso de la razón 1/6 y 55% superior en el caso de la razón 1/10. Así, es posible ver que el material sin pretratar genere menor concentración de etanol que el material pretratado tanto con PIL como con AIL.

Se utilizó en el análisis la productividad de etanol por gramo de LI (g/g LI). Los mejores resultados de este parámetro se muestran en la tabla III – 3:

**Tabla III-4: Mejores valores de productividad por gramo de LI para cada tipo de LI estudiado y las condiciones de operación correspondientes, para material pretratado a 110 °C de temperatura y 24 horas de SSF.**

<b>Líquido iónico</b>	<b>[g etanol/g LI]</b>	<b>Tiempo pretratamiento [h]</b>	<b>Razón biomasa/LI</b>
<b>AIL</b>	0,014	1	1/6
<b>PIL</b>	0,005	1	1/3

Un punto importante a considerar es el costo del líquido iónico. En la Figura III – 10 se observa que el rendimiento porcentual del PIL para la razón 1/10 es cercano al 10% y en el caso del AIL a razón 1/3 es de 15%. Esto que indica que utilizar PIL en mayor cantidad genera casi el mismo rendimiento que utilizar AIL en menor cantidad. En el caso de la productividad de etanol por gramo de LI, la diferencia es más notoria (Tabla III – 3), pues si se utiliza el doble de AIL que de PIL se genera casi el triple de etanol por gramo de LI. Sin embargo, el costo del AIL es cerca de 50 veces mayor al costo del PIL, por lo que en caso de diseñar un proceso de producción de bioetanol, es conveniente evaluar el precio de ambos líquidos iónicos y realizar un trade-off entre estos y la cantidad de etanol obtenida para cada uno de ellos, considerando además las otras ventajas que tiene el PIL sobre el AIL.

Finalmente, es importante mencionar el volumen de etanol generado por cada tonelada de material pretratado con AIL y con PIL. En el mejor de los casos (razón 1/10), este valor corresponde a 179 l EtOH/

ton de material pretratado con AIL, superior a lo obtenido por el material pretratado con PIL que alcanza 37 l EtOH/ton de material pretratado en las mismas condiciones. Es importante mencionar que en el trabajo de L. Martínez <sup>[21]</sup> se realizó una SSF durante 96 horas con material pretratado con [EMIM] [Ac], obteniendo un rendimiento de 412 l EtOH/ton de material pretratado, rendimiento que comparativamente, es superior a lo obtenido en este estudio. Esta diferencia se puede deber a que los resultados de este experimento presentaron una alta desviación estándar.

### III.5. Discusión general

Las concentraciones de etanol obtenidas para el material pretratado con PIL alcanzaron un máximo de 3,1 g/l (22% de rendimiento). En el caso del material pretratado con AIL este valor llegó hasta 9,2 g/l (65% de rendimiento). En cuanto al material sin pretratar, el máximo de concentración obtenido fue de 2,5 g/l (18% de rendimiento). Todas estas concentraciones fueron obtenidas para 110 °C con razón biomasa/LI de 1/10 luego de 72 horas de SSF.

Luego de hecho el estudio, se determina que las condiciones que mejor funcionan en el pretratamiento de biomasa lignocelulósica con 2 – HEAA (líquido iónico prótico), se obtienen luego de 1 hora de pretratamiento, 110 °C de temperatura, razón de biomasa/LI de 1/3 y aplicando una SSF por 24 horas.

Esta combinación de condiciones no significó el máximo de concentración de etanol de los ensayos realizados con PIL, si no que se basa en la repetitividad del proceso de pretratamiento y SSF, y considerando que realizar estos procesos no solo generan gastos en insumos de LI y materia prima, sino que también generan un costo energético al requerir ciertas condiciones de operación específicas. Sería recomendable realizar un modelo factorial de modo de determinar qué condiciones en conjunto producen la mayor cantidad de bioetanol, con las interacciones que no fueron consideradas en el análisis realizado.

Entonces, en las condiciones antes mencionadas, los mejores valores de productividad obtenidos de cada variable fueron los siguientes:

- Por hora SSF: 0,0012 g EtOH/h<sub>SSF</sub>
- Por hora de pretratamiento: 0,015 g EtOH/h<sub>pretratamiento</sub>
- Por gramo de PIL: 0,0043g EtOH/g LI

Con estos datos y un diseño factorial, sería posible obtener una productividad en g EtOH/h al determinar la interacción entre estas variables y su contribución en la concentración final de etanol por hora de proceso. Por esto, sería de utilidad modelar una función de costos que involucre las variables del proceso, tanto las condiciones de operación estudiadas en este trabajo, como la energía, los insumos necesarios y el etanol producido, de modo de poder optimizar esta función y obtener el máximo beneficio.

Es por esto que se recomienda realizar un estudio de factibilidad económica posterior a estos resultados, que pueda determinar si las bajas concentraciones y rendimientos de etanol obtenidos pueden ser compensados con una reducción en el costo del insumo LI, considerando también el gasto energético del proceso.

## IV. Conclusiones

Debido al agotamiento de las reservas de combustibles fósiles y la creciente demanda de consumo, al cambio climático producido por los gases de efecto invernadero y al cada vez mayor interés de los países de independizarse energéticamente, es que surge la motivación para el estudio de nuevas fuentes de energías no convencionales. Una de las fuentes de energía alternativa son los biocombustibles, entre ellos, el bioetanol de segunda generación, a partir de biomasa lignocelulósica. Este tipo de fuente de biomasa requiere de un pretratamiento que, entre otras formas, puede realizarse mediante la utilización de líquidos iónicos (LI).

El trabajo realizado consistió en evaluar el proceso de producción de bioetanol, variando condiciones de operación tanto en el pretratamiento con LI (tiempo, temperatura, razón biomasa/LI utilizado) como en la Sacarificación y Fermentación Simultáneas, SSF (tiempo).

Al evaluar las condiciones de pretratamiento con el líquido iónico prótico (PIL, por sus siglas en inglés) Acetato de 2- hidroxietilamonio (2 – HEAA) que generen la mayor producción de etanol luego de la SSF, se determinó que las condiciones que logran este objetivo en el pretratamiento de biomasa lignocelulósica, se obtienen luego de 1 hora de pretratamiento a 110 °C con razón de biomasa/LI de 1/3 y luego de aplicar una SSF por 24 horas. Las condiciones antes mencionadas produjeron 0,47 g de etanol por litro. Si bien no es la mayor concentración obtenida, es en estas condiciones que se obtiene el mayor valor para la productividad por hora de pretratamiento, gramo de LI utilizado y hora de SSF.

Para la determinación de estas condiciones se definió la productividad respecto del tiempo de pretratamiento y SSF, y a la cantidad de LI utilizado. Esto último es importante ya que el proceso de producción requiere mantener en el tiempo ciertas condiciones de temperatura, lo que consume energía y, aumenta los costos. Esto último, sumado al costo de adquirir cierta cantidad de LI puede disminuirla factibilidad económica de producir bioetanol de segunda generación. Serán útiles estos parámetros al momento de realizar un trade – off entre el alto costo del AIL respecto a la alta cantidad de etanol producida, y el bajo costo del PIL (50 veces menor) respecto a los bajos rendimientos obtenidos.

Por otro lado, se estudió el tiempo de SSF para 0, 24, 48 y 72 horas. Nuevamente, se determinó la productividad en función de la concentración de etanol generada por cada hora de SSF, lo que arrojó que el tiempo recomendable al realizar una SSF es de 24 horas, considerando la posible repetición del proceso.

Entonces, en las condiciones antes mencionadas, las mejores productividades obtenidas de cada variable fueron las siguientes:

- Por hora SSF: 0,0012 g EtOH/h<sub>SSF</sub>
- Por hora de pretratamiento: 0,015 g EtOH/h<sub>pretratamiento</sub>
- Por gramo de PIL: 0,0043 g EtOH/g LI

Además, fue posible demostrar que comparativamente, el líquido iónico aprótico (AIL) Acetato de 1-etil-3-metilimidazol ([EMIM] [Ac]) es muy superior al PIL Acetato de 2 – hidroxietilamonio (2-HEAA), siendo superior hasta en un 382% respecto a lo obtenido pretratando con PIL. Luego de la SSF, este último genera en el mejor de los casos un 10% de rendimiento porcentual para el pretratamiento durante 3 horas, a razón biomasa/LI de 1/10, en comparación al 50% obtenido por el pretratamiento con AIL a 110

°C. Es interesante mencionar que, como se mencionó anteriormente, es en estas condiciones donde el PIL genera su mayor productividad

Finalmente, aunque el estudio de los líquidos iónicos próticos aún se está iniciando en el campo de la degradación de la matriz lignocelulósica, bajo las conclusiones obtenidas anteriormente se puede inferir que el comportamiento del líquido iónico prótico 2 – HEAA aún dista mucho de lo obtenido por el AIL y es insuficiente para ser aplicado industrialmente en el proceso productivo de bioetanol de segunda generación. Sin embargo, puede ser útil hacer un estudio similar con otro PIL o realizar un estudio de factibilidad económica con los datos entregados en este trabajo, de modo de determinar si, a pesar de los bajos rendimientos, disminuyen los costos de producción al ser este PIL más barato.

## Recomendaciones

- Al ser el 2 – HEAA más económico que el [EMIM] [Ac], y porque produce mayor cantidad de etanol que el material sin pretratamiento, se recomienda realizar un estudio técnico – económico del proceso de producción de bioetanol a partir de material pretratado con 2 – HEAA. Esto con el fin de determinar si el ahorro en costos de insumo en cuanto al LI compensa los bajos rendimientos obtenidos, además de considerar dentro del estudio los gastos energéticos que conlleva mantener las condiciones de operación.
- Se recomienda estudiar el mismo conjunto de condiciones de operación con el PIL 2 – HEAF, dado su buen rendimiento en el estudio realizado por Nazife et al. Luego de ello, podría ser conveniente realizar el mismo estudio técnico – económico mencionado anteriormente.
- Se recomienda realizar futuros experimentos con tiempos menores a 72 horas de SSF, debido a que los índices entregados en este estudio indican que la contribución de una hora extra de SSF es poca si se aumenta el tiempo de SSF por más de 24 horas.
- Por lo anterior, sería recomendable realizar estudios en un intervalo de 0 a 24 horas de SSF, de modo de encontrar el tiempo que entregue mayor concentración por hora de SSF.
- Se recomienda realizar pretratamientos con razones biomasa/LI superiores a lo probado, debido a que el precio del 2 – HEAA es cerca de 50 veces menor que el precio del [EMIM] [Ac]. Una vez realizado esto, es recomendable realizar el estudio técnico – económico por las razones mencionadas en el primer punto de este apartado.
- En este sentido sería recomendable estudiar la factibilidad económica de un proceso de producción con ambas cargas de LI para determinar si la superioridad en generación de etanol de la razón 1/10 compensa el costo de utilizar tal cantidad de LI.
- Es recomendable modelar una función de costos que involucre las condiciones de operación, la energía consumida y los insumos necesarios, de modo de poder optimizar esta función y obtener el máximo beneficio.

## Referencias

- [1] Asociación For The Study Of Peak Oil And Gas, ASPO. “About peak oil: Understanding peak oil”. [En línea] <<http://www.peakoil.net/about-peak-oil>> [Consulta: 12 de junio de 2012]
- [2] Agencia Internacional De Energía, IEA. “Medium therm oil – gas markets 2011”. [En línea] <<http://www.iea.org/Textbase/npsum/mtogm2011SUM.pdf>> [Consulta: 02 de junio de 2012]
- [3] Redacción Crisis Energética (CE). “50 años de Hubbert”. [En línea]. Crisisenergetica.org. 9 de marzo, 2006. <<http://www.crisisenergetica.org/article.php?story=20060309101613975>> [Consulta: 24 de enero de 2013]
- [4] Aleklett K., Campbell, C.J. “The peak and decline of world oil and gas production”. Universidad de Uppsala, Suiza. 22 de octubre de 2003. [En línea] <<http://www.peakoil.net/files/OilpeakMineral-sEnergy.pdf>> [Consulta: 30 de junio de 2012]
- [5] Biocombustibles. “Impacto ambiental” [En línea] <[http://www.biocombustibles.cl/site/productos\\_impacto.htm](http://www.biocombustibles.cl/site/productos_impacto.htm)> [Consulta: 30 de junio de 2012]
- [6] Agencia Internacional De Energía, IEA. “CO<sub>2</sub> emissions from fuel combustion” Edición 2011. [En línea] <<http://www.iea.org/co2highlights/CO2highlights.pdf>> [Consulta: 30 de junio de 2012]
- [7] Agencia Internacional De Energía, IEA. “Energy Technology Perspectives2010: The role of energy scenarios and modeling”. 13 de enero de 2011. [En línea] <<http://www.itas.fzk.de/v/workshop-energieszenarien/Remme.pdf>> [Consulta: 23 de enero de 2013]
- [8] Gobierno de Chile. “Energía para un Desarrollo Sustentable”. 24 de noviembre de 2009. [En línea] <<http://www.gob.cl/programa-de-gobierno/oportunidades/energia/>> [Consulta: 30 de junio de 2012]
- [9] Anzi, Federico.”Biocombustibles”. Zonaeconomica.com. Junio, 2007. [En línea] <<http://www.zonaeconomica.com/biocombustibles>> [Consulta: 27 de enero de 2013]
- [10] Biocombustibles. “Productos: Definición de biocombustibles”. [En línea] <<http://www.biocombustibles.cl/site/productos.htm>> [Consulta: 30 de junio de 2012]
- [11] Lienqueo, María Elena. “Caracterización de la Biomasa”. [Diapositiva PowerPoint]. Energía Renovable a Partir de Biomasa (BT4551), Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile. 2011. [En línea] <[https://www.u-cursos.cl/ingenieria/2011/2/BT4551/1/m-aterial\\_docente/objeto/383154](https://www.u-cursos.cl/ingenieria/2011/2/BT4551/1/m-aterial_docente/objeto/383154)> [Consulta: 30 de junio de 2012]
- [12] Biocombustibles. “Biodiesel: Definición”. [En línea] <[http://www.biocombustibles.cl/site-/productos\\_biodiesel.htm](http://www.biocombustibles.cl/site-/productos_biodiesel.htm)> [Consulta: 30 de junio de 2012]
- [13] Biocombustibles. “Biogás: Definición”. [En línea] <[http://www.biocombustibles.cl/-site/productos\\_biogas.htm](http://www.biocombustibles.cl/-site/productos_biogas.htm)> [Consulta: 30 de junio de 2012]
- [14] Natureandpoverty.net. “Bioenergy potential and technological development”. [En línea] <<http://np-net.pbworks.com/w/page/12638810/Bioenergy%20potential%20and%20tech-nological%20development>> [Consulta: 1 de Julio de 2012]

- [15] Hackenberg, Norbert. “Biocombustibles de segunda generación”. Revista Virtual Redesma. [En línea] <<http://revistavirtual.redesma.org/vol4/articulo3.php?id=c1>> [Consulta: 1 de julio de 2012]
- [16] Biocombustibles. “Bioetanol: Definición”. [En línea] <[http://www.biocombustibles.cl/site/productos\\_bioetanol.htm](http://www.biocombustibles.cl/site/productos_bioetanol.htm)> [Consulta: 30 de junio de 2012]
- [17] Salazar, Oriana. “Bioetanol”. [Diapositiva PowerPoint]. Energía Renovable a Partir de Biomásas (BT4551), Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile. Diciembre 2011. [En línea] <[https://www.u-cursos.cl/ingenieria/2011/2/BT4551/1/material\\_do-cente/objeto/401509](https://www.u-cursos.cl/ingenieria/2011/2/BT4551/1/material_do-cente/objeto/401509)> [Consulta: 30 de junio de 2012]
- [18] Duffey, Annie, Stange Daniela, Comisión Económica para América Latina y el Caribe, CEPAL. “Estudio regional sobre economía de los biocombustibles 2010: temas clave para los países de América Latina y el Caribe”. Santiago de Chile. 28 y 29 de marzo, 2011 [En línea] <<http://www.cepal.cl/ddpe/agenda/2/42932/EstEconomiaBiocombustiblesDialPol.pdf>> [Consulta: 29 de enero de 2013]
- [19] Ecosectores. “Aumenta la producción mundial de bioetanol superando los 500 millones de barriles al año”. 9 de Julio, 2012. [En línea] <[https://ecosectores.com/DetalleArticulo/tabid/64/ArticleId/-517/Aumenta-la-produccion-mundial-de-bioetanol-superando-los-500-millones-de-barriles-al-año.aspx#.UQgd\\_R2ZSzk](https://ecosectores.com/DetalleArticulo/tabid/64/ArticleId/-517/Aumenta-la-produccion-mundial-de-bioetanol-superando-los-500-millones-de-barriles-al-año.aspx#.UQgd_R2ZSzk)> [Consulta: 29 de enero de 2013]
- [20] Márquez, Fabiana. “La nueva generación de etanol: El alto costo inicial es uno de los obstáculos para la implantación”. Bio&Sugar Magazine. [En línea] <[http://200.161.120.211/bio\\_sugar/knet/impresos/1676\\_10080.pdf](http://200.161.120.211/bio_sugar/knet/impresos/1676_10080.pdf)> [Consulta: 29 de enero de 2013]
- [21] Martínez, Loreto. “Estudio del proceso productivo de bioetanol a partir de residuos de eucalipto tratados con distintos líquidos iónicos”. Memoria (Ingeniero Civil En Biotecnología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 2012.
- [22] Cuervo, Laura (1); Folch, Jorge Luis (2); Quiroz, Rosa Estela (1,2). “Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol”. (1) Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM. (2) Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, México. 2009. [En línea] <[http://www.smbb.com.mx/revista/Revista\\_2009\\_3/Lignocelulo-sa.pdf](http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Lignocelulo-sa.pdf)> [Consulta: 1 de julio de 2012]
- [23] Heat Exchangers. “Termohidrólisis en la producción de biocombustibles de segunda generación (2/3)”. [En línea] <<http://www.hrs-heatexchangers.com/es/aplicaciones/biocombustibles/termo-hidrolisis-biomasa-biocombustible-bioetanol-biogas-2-3.aspx>> [Consulta: 1 de julio de 2012]
- [24] Barroso Casillas, Miguel. “Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería”. Madrid. Universidad Politécnica de Madrid, Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal, 2010. [En línea] <[http://oa.upm.es/10559/1/MIGUEL\\_BARROSO\\_CASILLAS.pdf](http://oa.upm.es/10559/1/MIGUEL_BARROSO_CASILLAS.pdf)> [Consulta: 29 de enero de 2013]
- [25] Niklitschek Contente, Tomás Andrés. “Selección de condiciones de fermentación de residuos de lenga para la producción de Bioetanol”. Memoria (Ingeniero Civil en Biotecnología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2011. 105 h.

- [26] Chun-Zhao Liu et al. (2012). “Ionic liquids for biofuel production: Opportunities and challenges”. Applied Energy, 92: 406–414.
- [27] LA GUIA DE QUIMICA. “Líquido Iónico”. [En línea] <<http://quimica.laguia2000.com/-conceptos-basicos/liquido-ionico>> [Consulta: 1 de julio de 2012]
- [28] Benavides, Virginia; Mancini, Pedro; Adam, Claudia; Fortunato, Graciela. “Líquidos iónicos próticos del tipo n-alquilimidazólicos: formación de micelas directas”. Laboratorio de Físicoquímica Orgánica, Departamento de Química, Facultad de Ingeniería Química, UN del Litoral, Santa Fe, Argentina. [En línea] <<http://www.aqa2010.org.ar/docs/qu%C3%ADmica%20-org%C3%A1nica008.pdf>> [Consulta: 1 de julio de 2012]
- [29] Nazife Isik Haykira et al. (2013) “Pretreatment of cotton stalk with ionic liquids including 2-hydroxy ethyl ammonium formate to enhance biomass digestibility”. Industrial Crops and Products 41: 430– 436.
- [30] Pinkert, André et al. (2009). “Ionic Liquids and Their Interaction with Cellulose”. Chemical Reviews, 109:6712-6728.
- [31] Jianji Wang, Yong Zheng and Suojiang Zhang (2010). The Application of Ionic Liquids in Dissolution and Separation of Lignocellulose, Clean Energy Systems and Experiences, Kei Eguchi (Ed.), ISBN: 978-953-307-147-3, In Tech, DOI: 10.5772/10083.
- [32] Olofsson, K., Bertilsson, M., Lindén, G. (2008). “A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks”. Biotechnology for Biofuels, 1:7.
- [33] Diagnino, Eliana., et al.(2012). “Hidrólisis enzimática de cascarilla de arroz pretratada con ácido diluido para evaluar la eficacia de la etapa de pretratamiento”. Universidad Tecnológica Nacional, Argentina.
- [34] BNDES, CGEE, CEPAL, FAO. Capítulo 05: Tecnologías avanzadas en la agroindustria de la caña de azúcar. En su: “Bioetanol de caña de azúcar”. Primera edición. Río de Janeiro, 2008. pp 123-149. [En línea] <<http://www.bioetanoldecana.org/es/download/cap5.pdf>> [Consulta: 31 de enero de 2013]
- [35] Tomás Pejó, M<sup>a</sup> Elia. “Bioetanol de paja de trigo: estrategias de integración de las etapas del proceso”. Memoria (doctor). Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid, Facultad De Ciencias Biológicas, 2010. 120 h. [En línea] <<http://eprints.ucm.es/10802/1/T31774.pdf>> [Consulta: 31 de enero de 2013]
- [36] Iglesias, Miguel. (2009). “Diseño de líquidos iónicos para procesos sostenibles”. Universidade Federal da Bahia, Salvador de Bahia, Brasil.
- [37] Alvarez, Victor. (2010). “Bronsted Ionic Liquids for Sustainable Processes: Synthesis and Physical Properties”. Chemical Engineering Journal, 55: 625–632.
- [38] Centro de Energías Renovables, CER. “Fermentación alcohólica”. Ministerio de Energía, Gobierno de Chile. [En línea] <<http://cer.gob.cl/tecnologias/biomasa/bioquimica/fermentacionalcoholica/>> [Consulta: 15 de febrero de 2013]
- [39] Rodrigo Gonzalez, contacto personal

- [40] Hyun Lee, Sang et al. (2008). “Ionic Liquid-Mediated Selective Extraction of Lignin From Wood Leading to Enhanced Enzymatic Cellulose Hydrolysis”. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 102 (5). 1368 – 1376.
- [41] Uniter Cargo. “Help: Glossary” [En línea] <<http://www.unitedcargo.com/help/glossary.-jsp?pageIndex=C>> [Consulta: 27 de febrero de 2013]
- [42] Agencia Internacional De Energía, IEA. “World Energy Outlook 2009”. [En línea] <<http://www.worldenergyoutlook.org/media/weoweb/2009/WEO2009.pdf>> [Consulta: 27 de febrero de 2013]
- [43] Harris, Ricardo. “Selección de pretratamientos en base a caracterización físico-química de residuos de *eucalyptus globulus* y *populus canadensis* para la producción de bioetanol”. Tesis (Magister en Ciencias de la Ingeniería, Mención Química, Ingeniero Civil en Biotecnología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 2012.
- [44] UTFSM, ODEPA, FIA, CEN. “Evaluación del Potencial Productivo de Biocombustibles en Chile con Cultivos Agrícolas Tradicionales”. Santiago, Marzo de 2007. [En línea] <[http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servicios-informacion/publica/Potencial\\_productivo\\_biocombustibles\\_en\\_Chile.pdf](http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servicios-informacion/publica/Potencial_productivo_biocombustibles_en_Chile.pdf)> [Consulta 1 de marzo de 2013]
- [45] M. Iglesias, contacto personal.
- [46] Oloffson et al. (2008). “A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks”. Biotechnology for Biofuels, I:7.
- [47] Vancov, Tony et al. (2012). “Use of ionic liquids in converting lignocellulosic material to biofuels.” Renewable Energy 45: 1 – 6.
- [48] Álvarez, V.H., et al. (2011). “Thermophysical properties of binary mixtures of {ionic liquid 2-hydroxyethylammonium acetate + (water, methanol or ethanol)}”. J. Chem. Thermodynamics, 43:997 – 1010.

## Anexos

### A. Composición porcentual de biomasa

En la tabla A – 1 se muestra la composición porcentual de celulosa, hemicelulosa y lignina presente en distintos tipos de biomasa.

**Tabla A-1: Composición de la distintos tipos de biomasa (Adaptación L. Cuervo <sup>[22]</sup>).**

<b>Material LignoCelulósica</b>	<b>Celulosa (%)</b>	<b>Hemicelulosa (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>
Madera dura	40 – 55	24 – 40	18 – 25
Madera Suave	45 – 50	25 – 30	25 – 35
Cáscara de nuez	25 – 30	25 – 30	30 – 40
Olote de maíz	45	35	15
Desechos de pastos	25 – 40	35 – 40	18 – 30
Papel	85 – 99	0	0 – 15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15 – 20	80 – 85	0
Algodón	80 – 95	0	0
Papel periódico	40 – 55	25 – 40	18 – 30
Desecho de papel de pulpeos químicos	60 – 70	10 – 20	5 – 10
Desechos sólidos de aguas residuales	8 – 15	ND	24 – 29
Desechos animales (cerdos)	6	28	ND
Desechos sólidos de ganado	1,6 – 4,7	1,4 – 3,3	2,7 – 5,7
Hierba Bermuda	25	35,7	64
Pastos de crecimiento rápido	45	31,4	12

En la tabla A – 2 se encuentra la composición porcentual de compuestos lignocelulósicos presentes en el eucalipto.

**Tabla A-2: Composición química del residuo de Eucalipto (Adaptación L. Martínez <sup>[21]</sup>)**

	<b>Composición</b>	
	<b>% Teórico</b>	<b>% Experimental</b>
<b>Lignina</b>	17 – 20	18
<b>Holocelulosa</b>	75 – 85	77
<b>Celulosa</b>	40- 50	40
<b>Hemicelulosa</b>		37
<b>Extraíble</b>	2 – 6	4,8
<b>Ceniza</b>	1	0,2

## B. Estructuras Lignocelulósicas

A continuación, se presentan las principales estructuras que componen la biomasa lignocelulósica

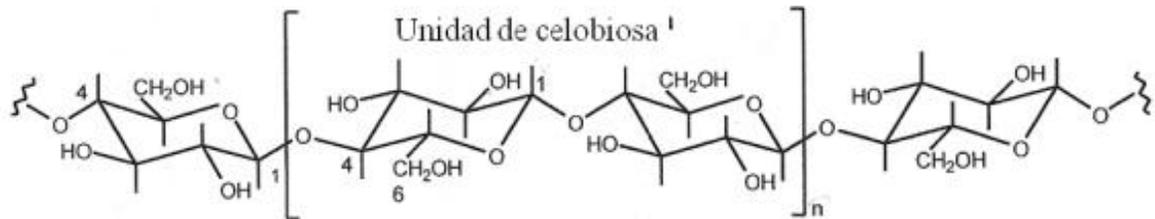


Figura B-1: Estructura de la celulosa [24].

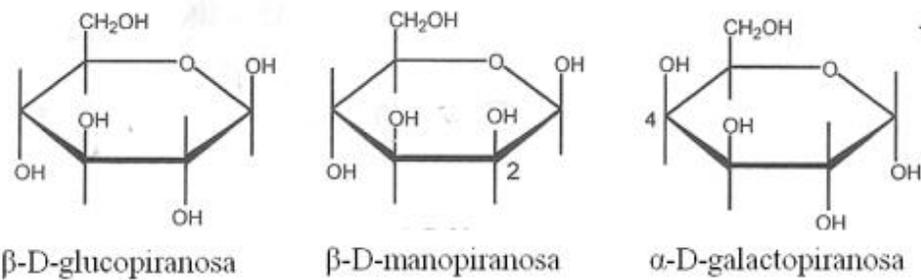


Figura B-2: Estructura de las principales hexosas presentes en la hemicelulosa [24].

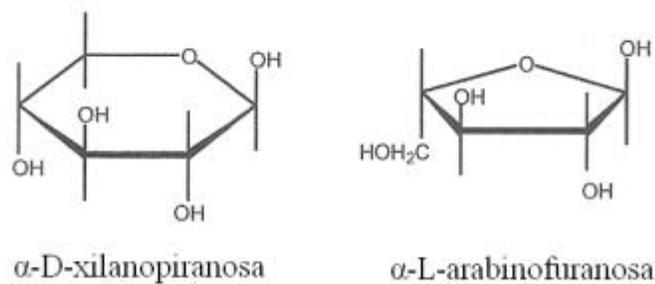


Figura B-3: Estructura de las principales pentosas presentes en la hemicelulosa [24].

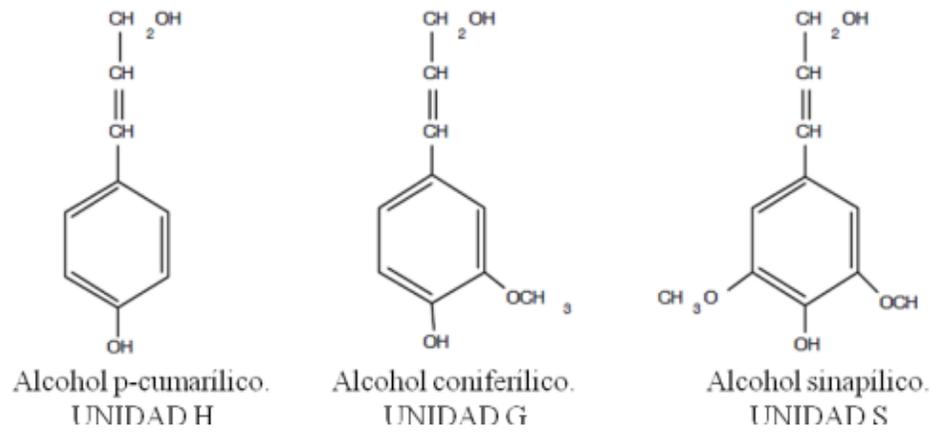


Figura B-4: Estructura de los principales grupos aromáticos que componen la lignina [24].

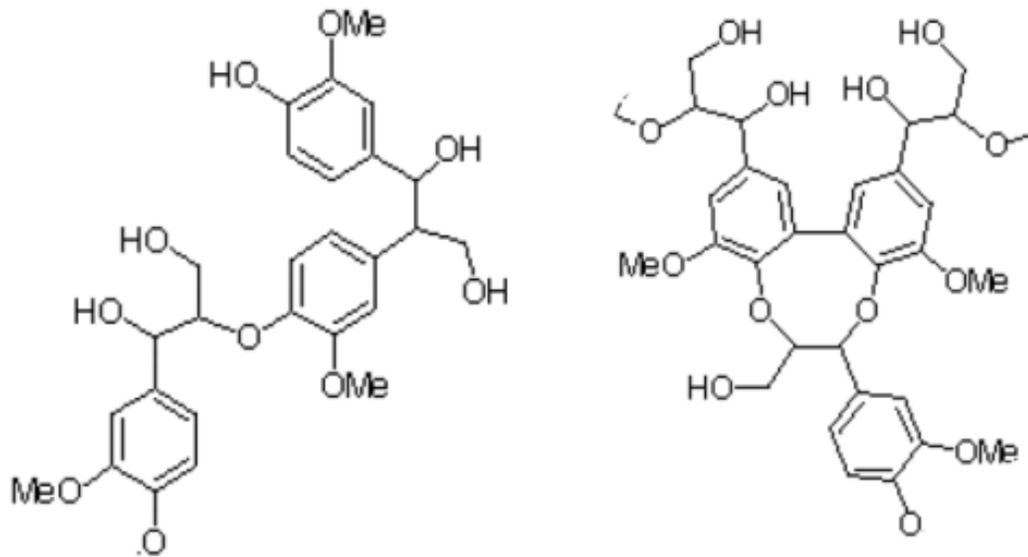
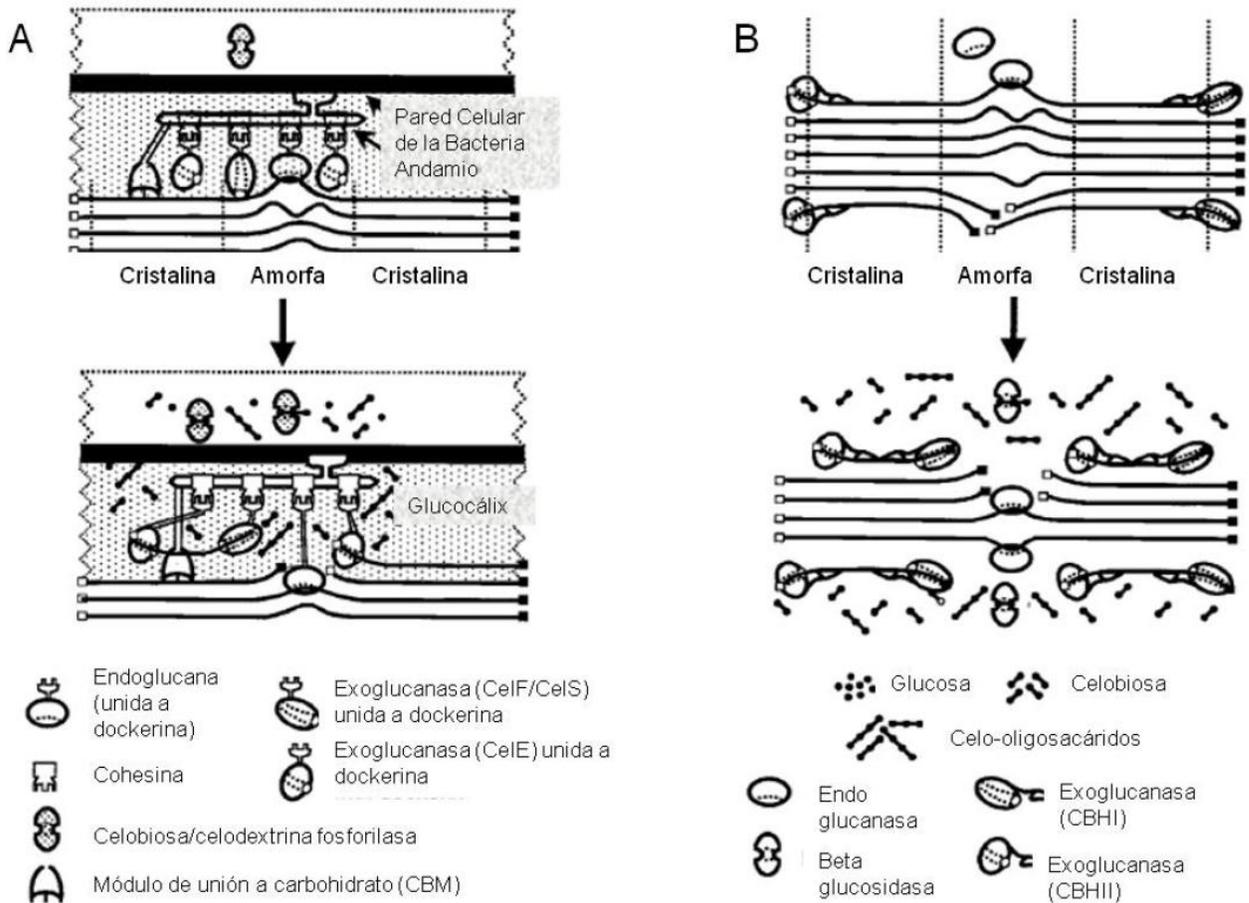


Figura B-5: Subestructuras de la lignina donde se muestran enlaces tipo éter  $\beta - O - 4$  y formas condensadas.

## C. Mecanismo de hidrólisis enzimática

A continuación se muestra gráficamente el mecanismo de acción de las enzimas en la hidrólisis enzimática. La figura C – 6.A muestra la interacción entre la red cristalina de celulosa y un sistema de celulasas complejo (Endoglucanasas, exoglucanasas, cohesina, celobiosa), y la figura C – 6.B muestra la misma interacción, pero con un sistema de celulasas no complejo (endoglucanasas, exoglucanasas y beta glucosidasa).



**Figura C-1: Representación esquemática de la hidrólisis de la celulosa amorfa y cristalina en el sistema de celulasas complejo (A) y no complejo (B) <sup>[22]</sup>.**

## D. Mejores resultados para cada condición

A continuación se presenta la tabla resumen para los valores máximos de concentración y los distintos rendimientos obtenidos para el análisis de resultados. Se puede observar que exceptuando el rendimiento de la concentración por hora de SSF (última columna), la mayoría de los máximos se obtienen a las 72 horas de SSF.

**Tabla D-1: Valores máximos de los resultados obtenidos en cada experimento, tanto para la concentración de etanol obtenido como para los rendimientos calculados. HEAA corresponde a los resultados del pretratamiento con PIL. C+ corresponde al material pretratado con [EMIM] [Ac]. C- corresponde a material sin pretratamiento.**

Pre-tratamiento	Muestra	Máximo etanol		Rendimiento porcentual y productividades por parámetro estudiado									
				%		l EtOH/ ton pret		g EtOH/ h <sub>pret</sub>		g EtOH/ g LI		g EtOH/ h <sub>SSF</sub>	
110 °C 1/10	HEAA	3,1	72 5h	22,1	72 5h	80	72 5h	0,04	72 1h	0,005	72 5h	0,0012	24 3h
	C+	9,2	72 3h	64,7	72 3h	233	72 3h	0,11	72 1h	0,015	72 3h	0,0059	24 3h
	C-	2,5	72 5h	17,5	72 5h	63	72 5h	0,03	72 1h		72 5h	0,0008	24 3h
110°C 1/6	HEAA	1,3	72 5h	9,2	72 5h	33	72 5h	0,01	72 5h	0,004	72 5h	0,0006	24 5h
	C+	7,6	72 3h	53,2	72 3h	191	72 3h	0,09	72 3h	0,021	72 3h	0,0036	24 1h
	C-	1,2	48 3h	8,1	48 3h	29	48 3h	0,02	48 3h		48 3h	0,0005	48 3h
110°C 1/3	HEAA	2,0	72 5h	13,9	72 5h	50	72 5h	0,04	72 5h	0,011	72 5h	0,0006	24 1h
	C+	8,2	72 5h	57,6	72 5h	207	72 5h	0,03	72 5h	0,045	72 5h	0,0048	24 5h
	C-	1,8	72 5h	13,9	72 1h	44	72 5h	0,02	72 5h		72 5h	0,0006	24 5h
70 °C 1/10	HEAA	1,3	72 5h	9,4	72 5h	34	72 5h	0,01	72 5h	0,002	72 5h	0,0005	24 3h
	C-	1,5	73 3h	10,6	72 3h	38	72 3h	0,01	72 3h		72 3h	0,0005	24 5h
70 °C 1/6	HEAA	1,4	72 1h	10,0	72 1h	36	72 1h	0,03	72 1h	0,004	72 1h	0,0004	48 1h
	C-	1,2	72 3h	8,2	72 3h	29	72 3h	0,02	72 3h		72 3h	0,0005	48 5h
70 °C 1/3	HEAA	1,4	72 5h	9,7	72 5h	35	72 5h	0,02	72 5h	0,008	72 5h	0,0004	24 5h
	C-	1,2	72 1h	8,7	72 1h	31	72 1h	0,02	72 1h		72 1h	0,0005	24 5h

## E. Resultados generales

Tabla E-1: Resultados de la SSF para material pretratado a 110 °C con razón biomasa/LI de 1/10.

Tiempo SSF [h]	Tiempo pret. [h]	Muestra	Etanol	Rendimiento		Productividad		
			g/l	%	l EtOH/ton pret	g EtOH/h <sub>pret</sub>	g EtOH/g LI	g EtOH/h <sub>SSF</sub>
0	1	HEAA	0,1	0,5	2,0	0,002	0,0001	
		C+	0,2	1,3	4,6	0,004	0,0003	
		C-	0,1	0,8	2,8	0,002		
	3	HEAA	0,9	6,4	23,1	0,006	0,0015	
		C+	0,7	5,1	18,3	0,005	0,0012	
		C-	0,7	5,0	18,0	0,005		
	5	HEAA	0,3	1,8	6,6	0,001	0,0004	
		C+	0,3	2,3	8,4	0,001	0,0006	
		C-	0,1	0,4	1,5	0,000		
24	1	HEAA	0,2	1,5	5,4	0,004	0,0004	0,0002
		C+	1,1	7,9	28,4	0,022	0,0019	0,0009
		C-	0,2	1,5	5,3	0,004		0,0002
	3	HEAA	1,5	10,3	37,0	0,010	0,0024	0,0012
		C+	7,0	49,6	178,5	0,047	0,0117	0,0059
		C-	0,9	6,6	23,8	0,006		0,0008
	5	HEAA	0,7	5,1	18,5	0,003	0,0012	0,0006
		C+	0,0	0,0	0,0	0,000	0,0000	0,0000
		C-	0,3	1,8	6,3	0,001		0,0002
48	1	HEAA	0,5	3,7	13,2	0,010	0,0009	0,0002
		C+	2,1	15,1	54,2	0,043	0,0036	0,0009
		C-	0,6	3,9	14,2	0,011		0,0002
	3	HEAA	2,1	14,5	52,2	0,014	0,0034	0,0009
		C+	8,7	61,3	220,8	0,058	0,0145	0,0036
		C-	1,6	11,4	41,1	0,011		0,0007
	5	HEAA	1,5	10,6	38,0	0,006	0,0025	0,0006
		C+	0,6	4,4	16,0	0,003	0,0011	0,0003
		C-	0,8	5,5	19,8	0,003		0,0003
72	1	HEAA	1,9	13,0	46,9	0,037	0,0031	0,0005
		C+	5,4	38,2	137,6	0,109	0,0091	0,0015
		C-	1,5	10,7	38,5	0,030		0,0004
	3	HEAA	2,2	15,6	56,0	0,015	0,0037	0,0006
		C+	9,2	64,7	232,7	0,061	0,0153	0,0026
		C-	1,6	10,9	39,3	0,010		0,0004
	5	HEAA	3,1	22,1	79,6	0,013	0,0052	0,0009
		C+	1,6	11,1	40,1	0,006	0,0026	0,0004
		C-	2,5	17,5	63,1	0,010		0,0007

**Tabla E-2: Resultados de la SSF para material pretratado a 110 °C con razón biomasa/LI de 1/6.**

Tiempo SSF [h]	Tiempo pret. [h]	Muestra	Etanol		Rendimiento		Productividad		
			g/l	%	l EtOH/ton pret	g EtOH/h <sub>pret</sub>	g EtOH/g LI	g EtOH/h <sub>SSF</sub>	
0	1	HEAA	0,3	2,1	7,7	0,006	0,0008		
		C+	0,4	2,5	9,1	0,007	0,0010		
		C-	0,4	3,0	10,6	0,008			
	3	HEAA	0,2	1,4	5,1	0,001	0,0006		
		C+	0,4	2,5	8,9	0,002	0,0010		
		C-	0,4	2,9	10,4	0,003			
	5	HEAA	0,5	3,3	11,9	0,002	0,0013		
		C+	0,3	1,8	6,3	0,001	0,0007		
		C-	0,2	1,7	6,1	0,001			
24	1	HEAA	0,35	2,5	8,9	0,007	0,0010	0,0003	
		C+	4,3	30,3	109,0	0,086	0,0119	0,0036	
		C-	0,3	2,2	7,9	0,006		0,0003	
	3	HEAA	0,5	3,6	12,8	0,003	0,0014	0,0004	
		C+	0,8	5,6	20,3	0,005	0,0022	0,0007	
		C-	0,39	2,7	9,9	0,003		0,0003	
	5	HEAA	0,7	4,8	17,1	0,003	0,0019	0,0006	
		C+	2,9	20,1	72,2	0,011	0,0079	0,0024	
		C-	0,39	2,7	9,9	0,002		0,0003	
48	1	HEAA	0,6	3,9	14,1	0,011	0,0015	0,0002	
		C+	0,9	6,1	21,8	0,017	0,0024	0,0004	
		C-	0,4	3,0	10,9	0,009		0,0002	
	3	HEAA	0,4	2,5	8,9	0,002	0,0010	0,0001	
		C+	2,1	14,4	52,0	0,014	0,0057	0,0009	
		C-	1,2	8,1	29,2	0,008		0,0005	
	5	HEAA	1,2	8,3	30,0	0,005	0,0033	0,0005	
		C+	5,2	36,7	132,1	0,021	0,0145	0,0022	
		C-	0,8	5,5	19,8	0,003		0,0003	
72	1	HEAA	0,49	3,4	12,3	0,010	0,0013	0,0001	
		C+	0,8	5,9	21,3	0,017	0,0023	0,0002	
		C-	1,0	7,0	25,1	0,020		0,0003	
	3	HEAA	0,9	6,2	22,3	0,006	0,0024	0,0002	
		C+	7,6	53,2	191,4	0,050	0,0210	0,0021	
		C-	0,8	5,4	19,5	0,005		0,0002	
	5	HEAA	1,3	9,2	33,1	0,005	0,0036	0,0004	
		C+	6,2	43,5	156,7	0,025	0,0172	0,0017	
		C-	0,7	4,9	17,7	0,0		0,0002	

**Tabla E-3: Resultados de la SSF para material pretratado a 110 °C con razón biomasa/LI de 1/3.**

Tiempo SSF [h]	Tiempo pret. [h]	Muestra	Etanol		Rendimiento		Productividad		
			g/l	%	l EtOH/ton pret	g EtOH/h <sub>pret</sub>	g EtOH/g LI	g EtOH/h <sub>SSF</sub>	
0	1	HEAA	0,3	2,1	7,7	0,006	0,0017		
		C-	0,2	1,3	4,6	0,004			
	3	HEAA	0,1	0,8	2,9	0,001	0,0006		
		C+	0,1	0,8	2,8	0,001	0,0006		
		C-	0,2	1,4	5,1	0,001			
	5	HEAA	0,1	0,8	2,8	0,000	0,0006		
		C+	0,2	1,6	5,8	0,001	0,0013		
		C-	0,1	0,8	2,8	0,000			
	24	1	HEAA	0,8	5,3	19,0	0,015	0,0042	0,0006
C-			0,5	3,8	13,7	0,011		0,0005	
3		HEAA	0,5	3,3	11,8	0,003	0,0026	0,0004	
		C+	2,1	15,0	54,0	0,014	0,0118	0,0018	
		C-	0,5	3,2	11,4	0,003		0,0004	
5		HEAA	0,6	4,2	15,2	0,002	0,0033	0,0005	
		C+	5,8	40,8	146,8	0,023	0,0322	0,0048	
		C-	0,7	4,7	17,0	0,003		0,0006	
48		1	HEAA	1,0	7,3	26,2	0,021	0,0058	0,0004
	C-		0,9	6,5	23,3	0,018		0,0004	
	3	HEAA	0,9	6,0	21,5	0,006	0,0047	0,0004	
		C+	3,2	22,5	81,1	0,021	0,0178	0,0013	
		C-	1,1	7,9	28,4	0,007		0,0005	
	5	HEAA	1,1	7,5	27,0	0,004	0,0059	0,0004	
		C+	5,6	39,7	142,7	0,023	0,0313	0,0023	
		C-	1,0	7,0	25,3	0,004		0,0004	
	72	1	HEAA	2,0	13,9	50,1	0,040	0,0110	0,0005
C-			1,2	13,9	29,4	0,023		0,0003	
3		HEAA	1,3	9,3	33,6	0,009	0,0074	0,0004	
		C+	3,0	20,8	75,0	0,020	0,0164	0,0008	
		C-	1,4	9,6	34,5	0,009		0,0004	
5		HEAA	2,0	13,9	50,2	0,008	0,0110	0,0006	
		C+	8,2	57,6	207,4	0,033	0,0454	0,0023	
		C-	1,8	12,3	44,4	0,007		0,0005	

**Tabla E-4: Resultados de la SSF para material pretratado a 70 °C con razón biomasa/LI de 1/10.**

Tiempo SSF [h]	Tiempo pret. [h]	Muestra	Etanol	Rendimiento		Productividad		
			g/l	%	l EtOH/ton pret	g EtOH/h <sub>pret</sub>	g EtOH/g LI	g EtOH/h <sub>SSF</sub>
0	1	HEAA	0,36	2,5	5,7	0,007	0,0006	
		C-	0,30	2,1	7,6	0,006		
	3	HEAA	0,27	1,9	6,8	0,002	0,0005	
		C-	0,10	0,7	2,5	0,001		
	5	HEAA	0,10	0,7	2,5	0,000	0,0002	
		C-	0,42	3,0	10,6	0,002		
24	1	HEAA	0,35	2,4	8,7	0,007	0,0006	0,0003
		C-	0,12	0,8	3,0	0,002		0,0001
	3	HEAA	0,58	4,1	14,6	0,004	0,0010	0,0005
		C-	0,47	3,3	11,9	0,003		0,0004
	5	HEAA	0,38	2,6	9,5	0,002	0,0006	0,0003
		C-	0,65	4,6	16,5	0,003		0,0005
48	1	HEAA	0,54	3,8	13,6	0,011	0,0009	0,0002
		C-	0,66	4,6	16,7	0,013		0,0003
	3	HEAA	0,88	6,2	22,3	0,006	0,0015	0,0004
		C-	0,30	2,1	7,6	0,002		0,0001
	5	HEAA	0,49	3,5	12,4	0,002	0,0008	0,0002
		C-	0,75	5,3	19,0	0,003		0,0003
72	1	HEAA	0,56	3,9	14,1	0,011	0,0009	0,0002
		C-	0,72	5,1	18,3	0,014		0,0002
	3	HEAA	0,98	6,9	24,8	0,007	0,0016	0,0003
		C-	1,50	10,6	38,0	0,010		0,0004
	5	HEAA	1,33	9	33,7	0,005	0,0022	0,0004
		C-	0,44	3,1	11,2	0,002		0,0001

**Tabla E-5: Resultados de la SSF para material pretratado a 70 °C con razón biomasa/LI de 1/6**

Tiempo SSF [h]	Tiempo pret. [h]	Muestra	Etanol	Rendimiento		Productividad		
			g/l	%	l EtOH/ton pret	g EtOH/h <sub>pret</sub>	g EtOH/g LI	g EtOH/h <sub>SSF</sub>
0	1	HEAA	0,09	0,6	2,2	0,002	0,000	
		C-	0,10	0,7	2,5	0,002		
	3	HEAA	0,11	0,8	2,8	0,001	0,0003	
		C-	0,13	0,9	3,3	0,001		
	5	HEAA	0,06	0,4	1,5	0,000	0,0002	
		C-	0,06	0,4	1,5	0,000		
24	1	HEAA	0,48	3,3	12,0	0,010	0,0013	0,0004
		C-	0,51	3,6	12,9	0,010		0,0004
	3	HEAA	0,38	2,7	9,6	0,003	0,0011	0,0003
		C-	0,51	3,6	12,9	0,003		0,0004
	5	HEAA	0,28	2,0	7,1	0,001	0,0008	0,0002
		C-	0,43	3,0	10,9	0,002		0,0004
48	1	HEAA	1,05	7,4	26,5	0,021	0,0029	0,0004
		C-	0,98	6,9	24,8	0,020		0,0004
	3	HEAA	0,81	5,7	20,4	0,005	0,0022	0,0003
		C-	0,70	4,9	17,7	0,005		0,0003
	5	HEAA	0,63	4,4	16,0	0,003	0,0018	0,0003
		C-	1,11	7,8	28,1	0,004		0,0005
72	1	HEAA	1,42	10,0	36,0	0,028	0,0039	0,0004
		C-	1,01	7,1	25,6	0,020		0,0003
	3	HEAA	0,97	6,8	24,5	0,006	0,0027	0,0003
		C-	1,16	8,2	29,4	0,008		0,0003
	5	HEAA	1,08	7,6	27,4	0,004	0,0030	0,0003
		C-	0,86	6,1	21,8	0,003		0,0002

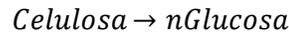
**Tabla E-6: Resultados de la SSF para material pretratado a 70 °C con razón biomasa/LI de 1/3.**

Tiempo SSF [h]	Tiempo pret. [h]	Muestra	Etanol		Rendimiento		Productividad		
			g/l	%	l EtOH/ton pret	g EtOH/h <sub>pret</sub>	g EtOH/g LI	g EtOH/h <sub>SSF</sub>	
0	1	HEAA	0,29	2,0	7,2	0,006	0,0016		
		C-	0,06	0,4	1,5	0,001			
	3	HEAA	0,25	1,8	6,3	0,002	0,0014		
		C-	0,29	2,0	7,4	0,002			
	5	HEAA	0,26	1,8	6,6	0,001	0,0014		
		C-	0,23	1,6	5,8	0,001			
24	1	HEAA	0,48	3,35	12,0	0,010	0,0026	0,0004	
		C-	0,44	3,10	11,2	0,009		0,0004	
	3	HEAA	0,49	3,45	12,4	0,003	0,0027	0,0004	
		C-	0,39	2,75	9,9	0,003		0,0003	
	5	HEAA	0,50	3,52	12,7	0,002	0,0028	0,0004	
		C-	0,55	3,87	13,9	0,002		0,0005	
48	1	HEAA	0,87	6,1	22,1	0,017	0,0048	0,0004	
		C-	1,01	7,1	25,6	0,020		0,0004	
	3	HEAA	0,49	3,5	12,4	0,003	0,0027	0,0002	
		C-	0,53	3,7	13,4	0,004		0,0002	
	5	HEAA	0,89	6,2	22,4	0,004	0,0049	0,0004	
		C-	0,87	6,1	22,1	0,003		0,0004	
72	1	HEAA	1,21	8,5	30,7	0,024	0,0067	0,0003	
		C-	1,24	8,7	31,4	0,025		0,0003	
	3	HEAA	0,82	5,7	20,7	0,005	0,0045	0,0002	
		C-	1,20	8,5	30,4	0,008		0,0003	
	5	HEAA	1,38	9,7	35,0	0,006	0,0077	0,0004	
		C-	1,14	8,0	28,9	0,005		0,0003	

## F. Memoria de cálculo

### F.a. Cálculo del etanol potencial

Para determinar la cantidad de etanol potencial presente en los residuos de eucalipto, es necesario considerar siguiente reacción:



Si se considera que el eucalipto cuenta con un 40% de celulosa, que el número de monómeros de glucosa en la celulosa (“n” de la reacción anterior) es de aproximadamente 10.000 <sup>[21]</sup> y que el peso molecular de la celulosa es de 1.296.000 g/mol <sup>[25]</sup>, es posible calcular la cantidad de glucosa potencial del residuo de eucalipto si se utiliza 1 gramo de esta biomasa, según las siguientes formulas:

$$\text{Celulosa potencial [g]} = \text{biomasa [g]} * \% \text{ de celulosa} = 1 \text{ g} * 40\% = 0,4 \text{ g}$$

$$\text{Celulosa [mol]} = \frac{\text{celulosa potencial [g]}}{PM_{\text{celulosa}}} = \frac{0,4 \text{ g}}{1.296.000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 3,1 * 10^{-7} \text{ moles}$$

$$\text{Glucosa [mol]} = n * \text{Celulosa [mol]} = 10.000 * 3,1 * 10^{-7} \text{ moles} = 3,1 * 10^{-3} \text{ moles}$$

Si se considera la reacción de fermentación mencionada en el capítulo I.2.iii (ecuación 2), se puede ver que un mol de glucosa genera 2 moles de etanol, por lo que para calcular la cantidad de etanol que se puede producir se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{Etanol potencial [mol]} = 2 * \text{glucosa potencial [mol]} = 2 * 3,1 * 10^{-3} \text{ moles} = 6,2 * 10^{-3} \text{ moles}$$

Si el peso molecular del etanol es de 46 g/mol, entonces se obtienen los gramos de etanol que puede generar 1 gramo de eucalipto.

$$\text{Etanol potencial [g]} = \text{etanol potencial [mol]} * PM_{\text{etanol}} = 6,2 * 10^{-3} * 46 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0,284 \text{ g}$$

Finalmente, es necesario tomar en cuenta el volumen en que se realizó la fermentación de modo de obtener la concentración potencial de etanol. En este caso, se utilizaron 20 ml como volumen de reacción.

$$\text{Etanol potencial} \left[ \frac{\text{g}}{\text{l}} \right] = \frac{\text{etanol potencial [g]}}{\text{volumen de reaccion [l]}} = \frac{0,284 \text{ g}}{20 \text{ ml}} * \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ l}} = 14,2 \frac{\text{g}}{\text{l}}$$

## F.b. Cálculo del rendimiento y parámetros utilizados

### F.b.1. Rendimiento porcentual

Luego de calculado el etanol potencial, se calculó el rendimiento porcentual de cada una de las concentraciones obtenidas. Por ejemplo, la concentración obtenida al pretratar con 2 – HEAA durante 3 horas en razón biomasa/LI de 1/3 a 110 °C luego de 24 horas de SSF es de 0,47 g/l. El rendimiento porcentual de estas condiciones se calcula de la siguiente manera

$$\text{Rendimiento } [\%] = \frac{\text{Etanol real } \left[ \frac{g}{l} \right]}{\text{etanol potencial } \left[ \frac{g}{l} \right]} * 100 = \frac{0,47 \frac{g}{l}}{14,2 \frac{g}{l}} * 100 = 3,3 \%$$

### F.b.2. Rendimiento [l EtOH/ton material pretratado]

En primer lugar, es necesario considerar que para realizar la SSF se utilizó 1g de eucalipto, además de conocer que la densidad del etanol es de 0,789 g/ml <sup>[21]</sup>. Para calcular este rendimiento, se deben calcular los gramos de etanol en la concentración obtenida en las condiciones mencionadas en el punto F.b.1, de la siguiente manera:

$$\text{Etanol } [g] = \text{etanol } \left[ \frac{g}{l} \right] * \text{volumen de reaccion } [l] = 0,47 \frac{g}{l} * 20 \text{ ml} * \frac{1 \text{ l}}{1000 \text{ ml}} = 0,0094 \text{ g}$$

Luego, se divide la masa obtenida por la densidad del etanol, de modo de determinar los litros obtenidos en el proceso

$$\text{Etanol } [ml] = \frac{(\text{etanol } [g])}{\text{densidad } \left[ \frac{g}{ml} \right]} = \frac{0,0094 \text{ g}}{0,789 \frac{g}{ml}} * \frac{1 \text{ l}}{1000 \text{ ml}} = 1,19 * 10^{-5} \text{ l}$$

Finalmente, se calculan los litros por tonelada de material. En este caso, se utilizó 1gramo de biomasa, lo que equivale a  $1 * 10^{-6}$  toneladas de material.

$$\text{Rendimiento } \left[ \frac{l \text{ EtOH}}{\text{ton mat pret}} \right] = \frac{1,19 * 10^{-5} \text{ l}}{1 * 10^{-6} \text{ ton mat pret}} = 11,9 \frac{l \text{ EtOH}}{\text{ton mat pret}}$$

### F.b.3. Productividad [g EtOH/h<sub>SSF</sub>]

Para el cálculo de esta productividad, se tomó el tiempo de SSF correspondiente a cada concentración de etanol. El valor que se está tomando como ejemplo (0,47 g/l) se hizo reaccionar por 24 horas en un volumen de 0,02 l. La productividad g EtOH/h<sub>SSF</sub> se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Rendimiento } \left[ \frac{g \text{ EtOH}}{h_{SSF}} \right] = \frac{0,47 \frac{g}{l}}{24 h_{SSF}} * 0,02 \text{ l} = 0,0004 \frac{g \text{ EtOH}}{h_{SSF}}$$

#### F.b.4. Productividad [g EtOH/h<sub>pretratamiento</sub>]

En este caso, se tomó el tiempo de pretratamiento correspondiente a cada concentración de etanol. El valor que se está tomando como ejemplo (0,47 g/l) se pretrató por 3 horas. La productividad g EtOH/h<sub>pretratamiento</sub> se calcula de la siguiente manera:

$$Productividad \left[ \frac{g \text{ EtOH}}{h_{\text{pretratamiento}}} \right] = \frac{0,47 \frac{g}{l}}{3 h_{\text{pretratamiento}}} * 0,02 l = 0,003 \frac{g \text{ EtOH}}{h_{\text{pretratamiento}}}$$

#### F.b.5. Productividad [g EtOH/g LI]

Finalmente, se consideró la cantidad de LI utilizada para la correspondiente concentración de etanol. Si se utilizó como base 1,2 gramos de biomasa y se pretrató con razón biomasa/LI de 1/3, la productividad para el valor que se está tomando como ejemplo (0,47 g/l) g EtOH/g LI se calcula de la siguiente manera:

$$Rendimiento \left[ \frac{g \text{ EtOH}}{g \text{ LI}} \right] = \frac{0,47 \frac{g \text{ EtOH}}{l}}{3 \frac{g \text{ LI}}{g \text{ biomasa}} * 1,2 g \text{ biomasa}} * 0,02 l = 0,0026 \frac{g \text{ EtOH}}{g \text{ LI}}$$

#### F.b.6. Diferencias porcentuales

El objetivo de calcular una diferencia porcentual es conocer cuan superior o inferior es un dato respecto de otro. En particular, en este trabajo se deseó conocer cuán superior es el pretratamiento del AIL respecto del PIL. Así, si la concentración obtenida con material pretratado con PIL a 110 °C con razón biomasa/LI de 1/10 por 3 horas luego de 24 horas de SSF es de 1,5 g/l y en el caso del AIL es de 7,0 g/l, la diferencia porcentual se calcula de la siguiente manera:

$$Diferencia \text{ porcentual } [\%] = \frac{\left| 1,5 \frac{g}{l} - 7,0 \frac{g}{l} \right|}{1,5 \frac{g}{l}} * 100 = 382\%$$

Si se desea calcular cuan inferior es el PIL que el AIL, solo se debe cambiar el valor del denominador.

## G. Imágenes

A continuación se muestran imágenes que ayudarán en la comprensión de algunos segmentos del trabajo realizado.



Figura G-1: Molino utilizado en tritución de eucaliptus.

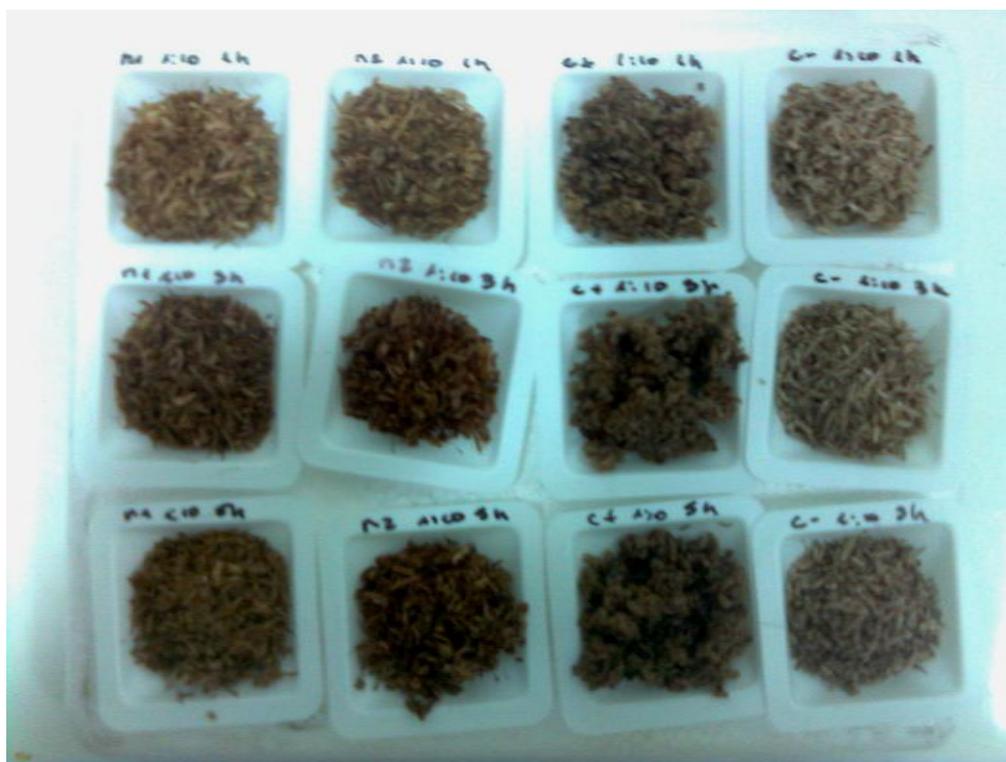


Figura G-2: Material listo para ser agregado al medio. Primera y segunda columna de material pretratado con PIL, tercera columna control positivo y última columna control negativo.