



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Industrias

Intensificación de las etapas de pretratamiento y sacarificación de residuos lignocelulósicos para obtener productos con valor agregado

Tesis presentada para optar al título de

Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Industrial

María del Pilar Balbi

Directora de Tesis: Dra. Miryan Celeste Cassanello Fernández

Director adjunto: Dr. Santiago Nicolás Fleite

Consejero de Estudios: Dr. Pablo Bonelli

Lugar de trabajo: Laboratorio de Reactores y Sistemas para la Industria (LARSI) –
Departamento de Industrias, FCEyN, UBA.

Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos (ITAPROQ,
UBA – CONICET).

Lugar: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Fecha de defensa: 21 de marzo 2025

Agradecimientos

A la Universidad de Buenos Aires, especialmente a la Facultad de Ingeniería y a la Facultad de Ciencias Exactas por permitirme formarme y crecer como profesional.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por financiar mis estudios de Doctorado.

A Miryan, por ser una directora increíble de quien aprendo todos los días. Gracias Mir por la confianza que tuviste en mí desde el primer momento. Es un placer trabajar con vos.

A Santi, por ser compañero, asistente, tutor, guía, etc., y amigo en este camino. Gracias también por acercar a Leo a mi vida. Los quiero.

A mis compañeros de docencia, de quienes aprendo mucho día a día, especialmente a Eli, por bancarse todas mis catarsis, y a Luciano, por cubrirme en más de una oportunidad.

A mis amigos, los de siempre y los que fui cosechando en este camino, por acompañarme siempre en todo lo que emprendo, por entenderme cuando más de una vez dije “no puedo, tengo que estudiar/trabajar”, y por ser mi “vía de escape”.

A mi mamá, única e incondicional. Gracias, má, por criarnos con la libertad de elegir hacer lo que nos haga felices. A mi papá, por transmitirme el valor del trabajo y la honestidad (y las mañas, ja!).

A mis hermanos, por cuidarme siempre, incluso cuando creo que no lo necesito. Por alentarme siempre a ir por más y por confiar en mí más que yo misma. Los quiero y los admiro.

A mis tíos y primos, especialmente a Tere, Trini y Pachi, por su amor dulce y sanador.

A mis abuelos, socios fundadores de este hermoso clan. Por ser ejemplo de vida y por haber sido refugio para todos nosotros.

A Gabi, mi amor, por su compañía incondicional, por ser la calma cuando todo me desborda, por entenderme mejor que nadie. Todo se volvió más hermoso y liviano desde que sos parte de mi vida, Ga. Gracias también por expandir mi familia.

Nada hubiera sido posible sin esta red maravillosa que sostiene, empuja y acompaña.

Resumen

Ante la crisis ambiental actual y la consecuente necesidad de alcanzar un desarrollo sostenible, la reutilización y revalorización de los residuos se ha convertido en una estrategia fundamental. En particular, los residuos lignocelulósicos (RLC) se vuelven de interés por la posibilidad de emplearlos como materia prima para la obtención de glucosa que a su vez resulta útil como materia prima en la producción de biocombustibles y otros productos por vía fermentativa. Sin embargo, los RLC presentan una serie de dificultades que imposibilitan al día de hoy su uso masivo como materia prima. Este trabajo de tesis analiza estrategias de intensificación en las etapas de pretratamiento y sacarificación enzimática de RLC para mejorar su conversión en productos de valor agregado.

En primer lugar, se realizó una hidrólisis ácida-oxidativa con peróxido de hidrógeno y ácido acético como método eficiente de delignificación, reduciendo inhibidores y facilitando la posterior hidrólisis enzimática.

Por otra parte, la cristalinidad y estabilidad del complejo celulosa-hemicelulosa dificultan la etapa de hidrólisis enzimática (sacarificación). Si bien es un proceso prometedor por ser seguro y considerado limpio, se requieren altas concentraciones de enzima para obtener buenos rendimientos, convirtiéndola en una etapa costosa. Considerando estas dificultades, se evaluó la cavitación hidrodinámica (HC) y el uso de un mezclador estático de contracción-expansión (CE) como técnicas innovadoras para mejorar la biodisponibilidad de la celulosa y optimizar el rendimiento del proceso. Asimismo, se evaluó el impacto del uso de surfactantes no iónicos como aditivos en la hidrólisis enzimática, explorando su influencia sobre la eficiencia de la sacarificación.

Los resultados obtenidos contribuyen al desarrollo de estrategias sostenibles para el aprovechamiento de RLC en el marco de una biorrefinería, promoviendo una economía circular y el uso eficiente de recursos renovables.

Palabras clave: Residuos lignocelulósicos, hidrólisis (sacarificación) enzimática, cavitación hidrodinámica, mezclador estático de contracción-expansión.

Enhancement of pretreatment and saccharification processes of lignocellulosic waste for the production of value-added compounds

Abstract

Considering the current environmental crisis and the consequent need to achieve sustainable development, the reuse and valorization of residues have become a fundamental strategy. Particularly, lignocellulosic residues (LCR) are of interest due to the possibility of using them to obtain glucose, which in turn is useful to produce biofuels and other products through fermentation. However, LCR present several challenges that currently prevent their massive use on an industrial scale.

This thesis explores process intensification strategies in the pretreatment and enzymatic hydrolysis of LCR to enhance their conversion into value-added products. First, an oxidative-acid hydrolysis using hydrogen peroxide and acetic acid was applied as an efficient delignification method, reducing inhibitors and facilitating subsequent enzymatic hydrolysis.

Additionally, the crystallinity and structural stability of the cellulose-hemicellulose complex represent significant challenges for enzymatic hydrolysis (saccharification). Although this process is considered safe and environmentally friendly, it requires high enzyme concentrations to achieve good yields, making an expensive step. To address these limitations, hydrodynamic cavitation (HC) and a contraction-expansion (CE) static mixer were evaluated as innovative techniques to improve cellulose bioavailability and optimize process efficiency. Furthermore, the impact of non-ionic surfactants as additives in enzymatic hydrolysis was assessed, exploring their influence on saccharification efficiency.

The results contribute to the development of sustainable strategies for LCR valorization within a biorefinery framework, promoting a circular economy and the efficient use of renewable resources.

Keywords: Lignocellulosic residues, Enzymatic hydrolysis (saccharification), Hydrodynamic cavitation, Static mixer of contraction-expansion.

Índice

Agradecimientos	ii
Resumen.....	iii
Abstract	iv
Índice.....	v
Índice de tablas	ix
Índice de figuras.....	x
Introducción y objetivos	1
Capítulo 1 : Revisión bibliográfica	6
1.1 Delignificación de los RLC	6
1.1.1 Características generales de los RLC.....	6
1.1.2 Hidrólisis ácida-oxidativa	10
1.2 Hidrólisis enzimática	13
1.2.1 Cocteles enzimáticos de celulasas	13
1.2.2 Surfactantes no iónicos como aditivos en la sacarificación.....	15
1.3 Cavitación hidrodinámica	18
1.3.1 El fenómeno de la cavitación.....	18
1.3.2 Características y parámetros relevantes en la cavitación hidrodinámica.....	20
1.3.3 Tipos de dispositivos de cavitación hidrodinámica	23
1.3.4 Procesos intensificados por cavitación hidrodinámica	24
1.4 Mezcladores estáticos	26
Capítulo 2 : Metodología	28
2.1 Sustratos empleados.....	28
2.1.1 Sustratos modelo utilizados como referencia	28
2.1.2 Residuos lignocelulósicos (RLC)	29
2.2 Caracterización de los sustratos	30
2.2.1 Determinación de humedad	30
2.2.2 Morfología y Composición.....	30
2.2.3 Cristalinidad.....	31
2.3 Acondicionamiento y molienda de los sustratos.....	31

2.4 Delignificación.....	32
2.5 Proceso de lavado de los residuos pretratados con HPAC	34
2.5.1 Lavado por inmersión	34
2.5.2 Lavado con recirculación de agua.....	35
2.5.3 Lavado con recirculación intensificado por cavitación hidrodinámica	36
2.5.3.1 Sin circulación del sólido.....	36
2.5.3.2 Con circulación del sólido.....	38
2.5.4 Lavado con recirculación intensificado con mezclador estático de contracción- expansión (CE).....	39
2.6 Sacarificación enzimática	40
2.6.1 Celulasas empleadas	41
2.6.2 Ensayos del proceso en batch	42
2.6.3 Ensayos del proceso con promoción del mezclado por recirculación del sólido.....	43
2.7 Determinación de la glucosa generada durante la sacarificación	44
Capítulo 3 : Optimización del proceso de Sacarificación en batch	47
3.1 Optimización del dosaje de enzima	47
3.2 Efecto del uso de surfactantes no-iónicos como agente de intensificación de la actividad de la enzima	49
3.3 Optimización de otros factores que puedan tener influencia en la sacarificación enzimática.	56
3.3.1 Evaluación de la posibilidad de evitar el uso de buffer	56
3.3.2 Efecto de la agitación y del área interfacial gas-líquido	56
3.3.3 Efecto de la relación sólido/líquido	59
3.4 Efecto del agregado de surfactantes en la sacarificación de residuos lignocelulósicos.....	61
Capítulo 4 : Intensificación de la sacarificación aplicando cavitación hidrodinámica durante la etapa de lavado.....	67
4.1 Caracterización de los sustratos	68
4.1.1 Morfología y Composición de los RLC empleados.....	68
4.1.2 Cristalinidad.....	75
4.1.3 Determinación de humedad	76
4.2 Sacarificación de los sustratos sometidos a un procedimiento de lavado intensificado por cavitación hidrodinámica, sin circulación de sólido	77

4.2.1 Efecto de la intensificación del lavado sobre la sacarificación de un sustrato modelo	77
4.2.2 Efecto de la intensificación del lavado sobre la sacarificación de residuos lignocelulósicos.....	81
4.2.2.1 Hojas de plátano (<i>Platanus acerifolia</i>).....	81
4.2.2.2 Maderas de distintas especies	83
4.3 Sacarificación de los sustratos sometidos a un procedimiento de lavado intensificado por cavitación hidrodinámica, con circulación de sólido	100
4.4 Efecto del número de pasos a través del dispositivo de cavitación	104
4.4.1 Sacarificación de <i>Eucalyptus sp</i>	104
4.4.2 Sacarificación de CMC	108
Capítulo 5 : Intensificación de la sacarificación mediante el empleo de un mezclador estático de contracción-expansión (CE).....	110
5.1 Diseño del mezclador estático de contracción-expansión (CE).....	110
5.1.1 Modelado	110
5.1.1.1 Determinación de la configuración óptima	110
5.1.1.2 Comportamiento de las gotas a través de un elemento de CE	113
5.1.2 Evaluación del dispositivo CE como mezclador/emulsificador	118
5.2 Lavado en recirculación intensificado por la promoción de turbulencia impuesta por un mezclador estático de CE.....	123
5.2.1 Efecto del número de pasos a través del CE	123
5.2.2 Comparación con los distintos procedimientos de intensificación de la etapa de lavado estudiados.....	127
5.3 Sacarificación en recirculación	135
5.3.1 Sacarificación en recirculación intercalando el mezclador estático de CE como promotor de turbulencia.....	135
5.3.2 Sacarificación en recirculación intercalando un dispositivo de cavitación hidrodinámica del tipo Venturi.....	136
Capítulo 6 : Conclusiones y perspectivas a futuro.....	138
6.1 Conclusiones principales	138
6.1.1 Eficiencia de la hidrólisis ácida oxidativa sobre los RLC empleados	138
6.1.2 Intensificación de la hidrólisis enzimática inducida por el procedimiento de lavado del sólido a sacarificar	138
6.1.2.1 Sustratos modelo	138

6.1.2.2 Residuos lignocelulósicos	139
6.1.3 Hidrólisis enzimática	141
6.1.3.1 Condiciones generales de operación	141
6.1.3.2 Uso de surfactantes no iónicos durante la hidrólisis enzimática	141
6.1.3.3 Hidrólisis enzimática en recirculación	143
6.2 Perspectivas a futuro	143
6.3 Producciones	144
6.3.1 Publicaciones	144
6.3.2 Participaciones en eventos científicos	144
Referencias.....	146

Índice de tablas

Tabla 2.1. Concentración de proteína y actividad de los cocteles comerciales de celulasas empleadas.....	42
Tabla 4.1. Contenido de lignina de los RLC crudos, estimada a partir de la norma TAPPI o de espectroscopía FTIR.	74
Tabla 4.2. Índice de cristalinidad de los sustratos sólidos sin pretratamiento.....	76
Tabla 4.3. Contenido de humedad de los sustratos sólidos crudos.	76
Tabla 4.4. Rendimiento de glucosa luego de 28 h y velocidad inicial de la sacarificación de RLC de madera, empleando diferentes procedimientos de lavados.	86
Tabla 4.5. Índice de cristalinidad de los distintos sustratos sólidos estudiados, teniendo en cuenta el procedimiento de lavado al que fueron sometidos.....	90
Tabla 4.6. Contenido de lignina de los distintos RLC estudiados, teniendo en cuenta el procedimiento de lavado al que fueron sometidos, estimada a partir de la norma TAPPI o de espectroscopía FTIR.	100
Tabla 5.1. Velocidad inicial de separación de fases evaluada a partir del cambio en la turbidez durante los primeros 300 s para mezclas de 5% v/v de aceite de girasol en agua con un 0.5% de Tritón X100 como surfactante, para los diferentes sistemas y condiciones estudiados.	122
Tabla 5.2. Contenido de lignina de <i>Eucalyptus sp.</i> , teniendo en cuenta el procedimiento de lavado al que fueron sometidas las muestras, estimada a partir de la norma TAPPI o de espectroscopía FTIR.....	135

Índice de figuras

Figura 1.1. Vías de conversión de los RLC en una biorrefinería y algunos productos que se pueden obtener a partir de ellos. Reformulado a partir de Saini et al. (2022).....	7
Figura 1.2. Composición y estructura de la biomasa lignocelulósica (Zhang et al., 2021a).	8
Figura 1.3. Modelo estructural de la lignina de madera. Reformulado a partir de Chávez-Sifontes et al. (2013).	9
Figura 1.4. Mecanismos de acción de las distintas celulasas sobre la biomasa lignocelulósica. Reformulado a partir de Zheng et al. (2021).....	14
Figura 1.5. Cavitación a través de un tubo Venturi. Gağol et al. (2018).	21
Figura 1.6. Esquema de los distintos dispositivos de cavitación hidrodinámica. (a) Rotatorio, (b) placa orificio, (c) tubo Venturi, (d) vortex. Reformulado a partir de Carpenter et al. (2016), Sarvothaman et al. (2018) y Hamidi et al. (2023).....	24
Figura 2.1. Diagrama de flujo del proceso de obtención de glucosa a partir de sustratos lignocelulósicos.....	28
Figura 2.2. Estructuras de los sustratos considerados modelo: a) Celulosa; b) Carboximetilcelulosa.	29
Figura 2.3. Equipos de reducción de tamaño. (a) Chipeadora (Potencia: 2500W). (b) Molino de hélice (Potencia: 850W; velocidad: 2800rpm; distribución de tamaños: 30-300mesh).	32
Figura 2.4. Baño termostatzado con agitación orbital donde se realizaron las hidrólisis ácido-oxidativas.	33
Figura 2.5. Esquema del sistema empleado para el lavado por inmersión.	35
Figura 2.6. Cono empleado para soportar el sólido. (a) Vacío. (b) Con el sustrato retenido por la tela filtrante.	35

Figura 2.7. Esquema del setup empleado para el procedimiento de lavado con recirculación de agua sin circulación de sólido.	36
Figura 2.8. Esquema y foto del dispositivo de cavitación tipo Venturi utilizado, diseñado siguiendo la propuesta de Saharan et al. (2011). (a) Croquis y dimensiones (b) Foto del agua circulando a través del Venturi.	37
Figura 2.9. Esquema del setup empleado para el procedimiento de lavado con recirculación intensificado por cavitación hidrodinámica, sin circulación de sólido.	38
Figura 2.10. Esquema del setup empleado para el procedimiento de lavado con recirculación intensificado por cavitación hidrodinámica, con circulación de sólido.	39
Figura 2.11. Esquema del setup empleado para el procedimiento de lavado con recirculación intensificado por promoción de turbulencia mediante un mezclador estático de CE.	40
Figura 2.12. Esquema del setup empleado para el procedimiento de lavado con recirculación a través de un caño sin contracciones.	40
Figura 2.13. Esquema del setup empleado en los ensayos de sacarificación enzimática con promoción del mezclado por recirculación del sólido	44
Figura 2.14. Esquema del procedimiento para determinación de glucosa.	45
Figura 2.15. Representación de la determinación de la velocidad inicial de reacción a partir de la curva de glucosa generada en función del tiempo.	46
Figura 3.1. Sacarificación de papel de filtro. Condiciones experimentales: (a) Surenzyma® AC-100: pH = 4.8, T = 323 K. (b) Novozymes Cellic CTec3® HS: pH = 5.0, T = 326 K	48
Figura 3.2. Estructura molecular de los surfactantes empleados.	49
Figura 3.3. Comparación del efecto de los aditivos sobre la sacarificación de papel de filtro. Velocidad inicial con a) Surenzyma® AC-100, b) Novozymes Cellic CTec3® HS; Rendimiento luego de 6 h con c) Surenzyma® AC-100, d) Novozymes Cellic CTec3® HS; Rendimiento luego de 28 h con e) Surenzyma® AC-100; f) Novozymes Cellic CTec3® HS.	51

Figura 3.4. Efecto de la concentración de surfactante sobre la sacarificación de papel de filtro: (a) Velocidad inicial, (b) Rendimiento luego de 6 h, (c) Rendimiento luego de 28 h.....	52
Figura 3.5. Comparación del efecto de los distintos surfactantes sobre la sacarificación enzimática de CMC: a) Evolución temporal de la masa de glucosa generada; (b) Rendimiento a las 6 h; (c) Rendimiento a las 28 h.....	53
Figura 3.6. Efecto del agregado de Dowfax 63N10 sobre la sacarificación enzimática de CMC y papel de filtro: (a) Evolución temporal del rendimiento de glucosa generada; (b) Rendimiento a las 6 h; (c) Rendimiento a las 28 h.....	55
Figura 3.7. Sacarificación de papel de filtro asistido por el agregado de Dowfax 63N10 con y sin regulación de pH. Condiciones experimentales: T= 50°C, pH inicial= 4,75.....	56
Figura 3.8. Efecto de la agitación sobre la sacarificación de papel de filtro: (a) Velocidad inicial, (b) Rendimiento luego de 6 h, (c) Rendimiento luego de 28 h.....	57
Figura 3.9. Efecto del área interfacial gas-líquido en la sacarificación de papel de filtro: (a) Velocidad inicial, (b) Rendimiento luego de 6 h, (c) Rendimiento luego de 28 h.....	58
Figura 3.10. Efecto de la relación sólido/líquido en la sacarificación de papel de filtro: (a) Velocidad inicial; (b) Rendimiento luego de 6 h, (c) Rendimiento luego de 28 h.....	60
Figura 3.11. Efecto del agregado de distintos surfactantes durante la sacarificación enzimática de hojas de <i>Platanus acerifolia</i> delignificadas: (a) Velocidad inicial; (b) rendimiento a las 6 h; (c) Rendimiento a las 28 h.....	62
Figura 3.12. Efecto del agregado de distintos surfactantes durante la sacarificación enzimática de <i>Eucalyptus sp.</i> delignificado: (a) Velocidad inicial; (b) rendimiento a las 6 h; (c) Rendimiento a las 28 h.....	63
Figura 3.13. Efecto del agregado de Dowfax 63N10 en la sacarificación de RLC. Velocidad inicial para: (a) hojas de <i>Platanus acerifolia</i> , (b) <i>Eucalyptus sp.</i> . Rendimiento luego de 6 h para: (c) hojas de <i>Platanus acerifolia</i> , (d) <i>Eucalyptus sp.</i> . Rendimiento luego de 28 h para: (e) hojas de <i>Platanus acerifolia</i> , (f) <i>Eucalyptus sp.</i>	64

Figura 4.1. Esquema de los sistemas de circulación: a. Traqueidas (coníferas); b. Vasos conductores (latifoliadas). Reformulado a partir de Berg (2008) y Benaiges (2019).	69
Figura 4.2. Obtención de un cubo a partir de los tres cortes anatómicos (Giménez, 2005).	69
Figura 4.3. Aspecto microscópico de la madera. (a) Coníferas. (b) Latifoliadas (Giménez, 2005).	70
Figura 4.4. Imágenes de la microscopía SEM de los sustratos sólidos. (a), (b) <i>Eucalyptus sp.</i> ; (c), (d) <i>Tipuana tipu</i> ; (e), (f) <i>Pinus sp.</i> . Magnificación: a la izquierda x200 (escala indicada de 40 μ m) y a la derecha x2000 (escala indicada de 4 μ m).	71
Figura 4.5. Imágenes de la microscopía óptica de Papel de filtro. Magnificación: a la izquierda x10 (escala 187:1) y a la derecha x40 (escala 735:1).	72
Figura 4.6. Imágenes de la microscopía óptica de los RLC. (a) <i>Eucalyptus sp.</i> ; (b) <i>Tipuana tipu</i> ; (c) <i>Pinus sp.</i> . Magnificación: a la izquierda x10 (escala 187:1) y a la derecha x40 (escala 735:1).	73
Figura 4.7. Espectros obtenidos por DRX de los sustratos crudos (sin pretratamiento). Las líneas punteadas indican el ángulo de $\theta=22.5^\circ$ cercana al pico cristalino a partir del cual se toma la intensidad de la celulosa cristalina y $\theta=18^\circ$ cercana al valle donde se determina la intensidad relacionada con la celulosa amorfa, ambas según el método de Segal et al. (1959).	75
Figura 4.8. Comparación del efecto de los distintos procedimientos de lavado sobre la sacarificación enzimática de papel de filtro. (a) Velocidad inicial. (b) Rendimiento de glucosa luego de 6 h. (c) Rendimiento de glucosa luego de 28 h. “Crudo” indica el papel de filtro sin lavar ni mojar.	78
Figura 4.9. Microscopía de barrido electrónico (SEM) de papel de filtro sometido a distintos procedimientos de lavado. (a) Lavado por inmersión, (b) Lavado en recirculación intensificado por cavitación hidrodinámica (c) Lavado en recirculación intensificado por cavitación hidrodinámica con adición de H_2O_2 (0.3%). Magnificación aproximada: x2000 (izquierda) y x10000 (derecha).	80

Figura 4.10. Comparación del efecto del procedimiento de lavado sobre la sacarificación de hojas de *Platanus acerifolia*. (a) Velocidad inicial. (b) Rendimiento de glucosa luego de 6 h. (c) Rendimiento de glucosa luego de 28 h. 82

Figura 4.11. Comparación del efecto del procedimiento de lavado sobre la sacarificación de madera de *Eucalyptus sp.*, *Tipuana tipu* y *Pinus sp.*. (a) Velocidad inicial. (b) Rendimiento de glucosa luego de 6 h. (c) Rendimiento de glucosa luego de 28 h. 85

Figura 4.12. Espectros obtenidos por DRX de las muestras de papel de filtro crudo (sin pretratamiento) y lavado por inmersión o en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica. Las líneas punteadas indican el ángulo del pico cristalino y del valle amorfo para calcular el índice según el método de Segal et al. (1959). 87

Figura 4.13. Espectros obtenidos por DRX de las muestras de *Eucalyptus sp.*, cruda (sin pretratamiento) y delignificadas con HPAC y lavadas por inmersión o en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica. Las líneas punteadas indican el ángulo del pico cristalino y del valle amorfo para calcular el índice según el método de Segal et al. (1959). 88

Figura 4.14. Espectros obtenidos por DRX de las muestras de *Tipuana tipu*, cruda (sin pretratamiento) y delignificadas con HPAC y lavadas por inmersión o en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica. Las líneas punteadas indican el ángulo del pico cristalino y del valle amorfo para calcular el índice según el método de Segal et al. (1959). 88

Figura 4.15. Espectros obtenidos por DRX de las muestras de *Pinus sp.*, cruda (sin pretratamiento) y delignificadas con HPAC y lavadas por inmersión o en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica. Las líneas punteadas indican el ángulo del pico cristalino y del valle amorfo para calcular el índice según el método de Segal et al. (1959). 89

Figura 4.16. Microscopia de barrido electrónico (SEM) de *Eucalyptus sp.* sometido a diferentes tratamientos: (a) crudo (sin pretratamiento), (b) delignificado con HPAC y lavado por inmersión, (c) delignificado con HPAC y lavado en recirculación con intensificación por cavitación hidrodinámica. Magnificación aproximada: x200 (izquierda), x2000 (derecha). 92

Figura 4.17. Microscopia de barrido electrónico (SEM) de *Tipuana tipu* sometido a diferentes tratamientos: (a) crudo (sin pretratamiento), (b) delignificado con HPAC y lavado por inmersión, (c) delignificado con HPAC y lavado en recirculación con intensificación por cavitación hidrodinámica. Magnificación aproximada: x200 (izquierda), x2000 (derecha). 93

Figura 4.18. Microscopia de barrido electrónico (SEM) de *Pinus sp.* sometido a diferentes tratamientos: (a) crudo (sin pretratamiento), (b) delignificado con HPAC y lavado por inmersión, (c) delignificado con HPAC y lavado en recirculación con intensificación por cavitación hidrodinámica. Magnificación aproximada: x200 (izquierda), x2000 (derecha). 94

Figura 4.19. Microscopía óptica de tinción de los distintos RLC sometidos a diferentes tratamientos. a) *Eucalyptus sp.*: a.1) crudo (sin pretratamiento), a.2) delignificado con HPAC y lavado por inmersión, a.3) delignificado con HPAC y lavado en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica. b) *Tipuana tipu*: b.1) crudo (sin pretratamiento), b.2) delignificado con HPAC y lavado por inmersión, b.3) delignificado con HPAC y lavado en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica. c) *Pinus sp.*: c.1) crudo (sin pretratamiento), c.2) delignificado con HPAC y lavado por inmersión, c.3) delignificado con HPAC y lavado en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica. La flecha blanca indica la presencia de aire ocluido..... 95

Figura 4.20. Espectros obtenidos por FTIR de las muestras de *Eucalyptus sp.*, cruda (sin pretratamiento) y delignificadas con HPAC y lavadas por inmersión o en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica. Se incluye también la muestra de papel de filtro para referencia comparativa. Las líneas punteadas delimitan el rango considerado en la integración para estimar el contenido de lignina. 97

Figura 4.21. Espectros obtenidos por FTIR de las muestras de *Tipuana tipu*, cruda (sin pretratamiento) y delignificadas con HPAC y lavadas por inmersión o en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica. Se incluye también la muestra de papel de filtro para referencia comparativa. Las líneas punteadas delimitan el rango considerado en la integración para estimar el contenido de lignina. 98

Figura 4.22. Espectros obtenidos por FTIR de las muestras de <i>Pinus sp.</i> , cruda (sin pretratamiento) y delignificadas con HPAC y lavadas por inmersión o en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica. Se incluye también la muestra de papel de filtro para referencia comparativa. Las líneas punteadas delimitan el rango considerado en la integración para estimar el contenido de lignina.	99
Figura 4.23. Comparación del efecto del método de lavado sobre la sacarificación de polvo de <i>Eucalyptus sp.</i> (a) Velocidad inicial. (b) Rendimiento de glucosa luego de 6 h. (c) Rendimiento de glucosa luego de 28 h.....	103
Figura 4.24. Efecto del número de pasos a través del dispositivo de cavitación sobre la sacarificación de polvo de <i>Eucalyptus sp.</i> cuando la etapa de lavado se intensifica por HC sin circulación de sólido. (a) Evolución temporal de la masa de glucosa generada durante las primeras 6 h. (b) Rendimiento luego de 6 h. (c) Rendimiento luego de 28 h.....	105
Figura 4.25. Efecto del número de pasos a través del dispositivo de cavitación sobre la sacarificación de polvo de <i>Eucalyptus sp.</i> cuando la etapa de lavado se intensifica por HC con circulación de sólido. (a) Evolución temporal de la masa de glucosa generada durante las primeras 6 h. (b) Rendimiento luego de 6 h. (c) Rendimiento luego de 28 h.....	107
Figura 4.26. Efecto del número de pasos a través del dispositivo de cavitación para una solución acuosa de CMC 0.05%.	108
Figura 5.1. Variación del módulo de la media cuadrática de la componente vertical de la velocidad del fluido en función de las relaciones D_C/D_E y L_C/L_E . $Re= 10000$	112
Figura 5.2. Esquema de dos elementos de contracción-expansión (CE).	113
Figura 5.3. Efecto de un elemento CE sobre las gotas simuladas como VOF a $Re= 2000$. Los números a la izquierda de cada imagen indican el tiempo en segundos desde la entrada.	115
Figura 5.4. Efecto de un elemento CE sobre las gotas simuladas como VOF a $Re= 10000$. Los números a la izquierda de cada imagen indican el tiempo en segundos desde la entrada.	116

Figura 5.5. Campo de velocidades a través de la contracción y al inicio de la expansión para un elemento de CE a $t= 5$ s para $Re= 2000$ y a $t= 1$ s para $Re= 10000$	117
Figura 5.6. Esquema del <i>setup</i> empleado para evaluar la eficiencia del CE como emulsificador.	119
Figura 5.7. Curvas de turbidez en función del tiempo de las emulsiones obtenidas a $Re= 10000$	121
Figura 5.8. Curvas de turbidez en función del tiempo de las emulsiones obtenidas a $Re = 2000$	122
Figura 5.9. Efecto del número de pasos a través del dispositivo de CE para papel de filtro. (a) Velocidad inicial de generación de glucosa. (b) Rendimiento luego de 6 h. (c) Rendimiento luego de 28 h.	124
Figura 5.10. Efecto del número de pasos a través del dispositivo de CE para <i>Eucalyptus sp.</i> (a) Velocidad inicial de generación de glucosa. (b) Rendimiento luego de 6 h. (c) Rendimiento luego de 28 h.	126
Figura 5.11. Comparación de los efectos de los distintos métodos de lavado sobre la sacarificación enzimática de papel de filtro. (a) Velocidad inicial. (b) Rendimiento de glucosa luego de 6 h. (c) Rendimiento de glucosa luego de 28 h.	128
Figura 5.12. Microscopía de barrido electrónico (SEM) de papel de filtro sometido a distintos procedimientos de lavado. (a) Lavado por inmersión, (b) Lavado en recirculación intensificado por cavitación hidrodinámica (c) Lavado en recirculación intensificado por cavitación hidrodinámica con adición de H_2O_2 (0.3%). (d) Lavado en recirculación empleando el mezclador de CE como promotor de turbulencia. Magnificación aproximada: x2000 (arriba) y x10000 (abajo).	129
Figura 5.13. Comparación de los efectos de los distintos procedimientos de lavado sobre la sacarificación enzimática de <i>Eucalyptus sp.</i> (a) Velocidad inicial. (b) Rendimiento de glucosa luego de 6 h. (c) Rendimiento de glucosa luego de 28 h.	132

Figura 5.14. Microscopía de barrido electrónico (SEM) de *Eucalyptus sp.* sometidos a diferentes tratamientos. (a) crudo (sin pretratamiento), (b) delignificado con HPAC y lavado por inmersión, (c) delignificado con HPAC y lavado en recirculación con intensificación por cavitación hidrodinámica, (d) delignificado con HPAC y lavado en recirculación empleando el mezclador de CE como promotor de turbulencia. 133

Figura 5.15. Espectros obtenidos por FTIR de las muestras de *Eucalyptus sp.*, cruda (sin pretratamiento) y delignificadas con HPAC y lavadas por inmersión, en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica o en recirculación intercalando el mezclador de CE como promotor de turbulencia. Se incluye también la muestra de papel de filtro para referencia comparativa.. 134

Figura 5.16. Curvas de rendimiento (%) de las sacarificaciones de papel de filtro en recirculación con distintas velocidades e intercalando el mezclador de CE como promotor de turbulencia. El gráfico presenta un salto de escala en el eje horizontal entre las 6 y las 23 h para mayor claridad. 136

Figura 5.17. Curvas de rendimiento (%) de las sacarificaciones de papel de filtro en recirculación intercalando el mezclador de CE o el dispositivo de cavitación hidrodinámica tipo Venturi, e impulsados por la bomba tornillo. El gráfico presenta un salto de escala en el eje horizontal entre las 6 y las 23 h para mayor claridad..... 137

Introducción y objetivos

La crisis energética y ambiental actual surge de la dependencia excesiva de los combustibles fósiles, responsables en gran parte de las emisiones de gases de efecto invernadero y el cambio climático. A medida que los recursos no renovables se agotan y las consecuencias ambientales se agravan, se vuelve fundamental una transición hacia fuentes de energía más sostenibles. En este contexto, las energías alternativas derivadas de la biomasa emergen como una solución prometedora, tratándose de un recurso renovable apto para producir biocombustibles, bioenergía y bioproductos (Chauhan et al., 2025). Las biorrefinerías juegan un papel fundamental en esta transición, al permitir el aprovechamiento integral de la biomasa. Inspiradas en las refinerías de petróleo, estas instalaciones procesan residuos para generar no solo energía, sino también productos químicos y materiales de alto valor agregado. Además de reducir las emisiones de carbono, las biorrefinerías promueven una economía circular al transformar desechos en recursos útiles, contribuyendo a la sostenibilidad energética y ambiental (Cazier et al., 2024; Lindorfer et al., 2019; Saini et al., 2022). En este sentido, la presente tesis se enfoca en la búsqueda de nuevas alternativas sustentables para la obtención de productos de interés a partir de residuos, alineándose con el concepto de biorrefinería y su potencial para transformar desechos en recursos valiosos.

En este contexto, los residuos lignocelulósicos surgen como una de las principales fuentes alternativas debido a su gran disponibilidad, su potencial y su bajo costo (Eades et al., 2020; Ray et al., 2025; Sulis et al., 2025). Sin embargo, el aprovechamiento y utilización de estos residuos para la obtención de azúcares fermentables, que permitan producir biocombustibles y otros productos químicos de valor agregado, continúa siendo un desafío (Bueno Moron et al., 2025). Una de las barreras más críticas para el uso masivo de los residuos lignocelulósicos (RLC) como materia prima para la producción de productos de interés y biocombustibles es su contenido de lignina y la estabilidad de la estructura de la celulosa-hemicelulosa (Arévalo-Gallegos et al., 2017; Guo et al., 2018; Srivastava et al., 2019; Zhang et al., 2021a). Por este motivo, se requieren métodos de pretratamiento severos antes de poder utilizar los residuos en un bioproceso o como materias primas alternativas, que frecuentemente conducen a la generación de compuestos que complican la hidrólisis enzimática posterior y eventual fermentación. Se han propuesto numerosos y variados métodos en las últimas décadas, pero al día de hoy se continúa en la búsqueda de un

pretratamiento eficiente y económicamente competitivo (Pereira et al., 2025; Thite y Nerurkar, 2019).

La hidrólisis alcalina es una de las propuestas con mayor aceptación por su eficiencia en la eliminación de lignina con bajo consumo de energía, dado que requiere condiciones de operación relativamente moderadas. Sin embargo, consume una cantidad de reactivos significativa (Kininge y Gogate, 2022; Zhang et al., 2021a), genera gran cantidad de sales, lo cual es un inconveniente si uno desea utilizar la lignina como subproducto (Liu et al., 2024; de Oliveira et al., 2025; Terán Hilares et al., 2018) y puede complicar la sacarificación posterior (Pereira et al., 2025; Tan et al., 2025). En esta tesis se utilizó una hidrólisis ácida-oxidativa que emplea ácido acético y peróxido de hidrógeno para lograr la delignificación de distintos RLC de alta disponibilidad en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Esta hidrólisis ácida-oxidativa se presenta como una alternativa prometedora ya que conduce a un alto porcentaje de remoción de lignina manteniendo un excelente rendimiento de sólidos sacarificables. Otra de las ventajas de la hidrólisis ácida-oxidativa es la baja generación de inhibidores que puedan perjudicar la etapa siguiente de hidrólisis enzimática porque se trabaja en condiciones moderadas de temperatura y presión (Mota et al., 2019; Wi et al., 2015; Ying et al., 2023).

A pesar de que se ha podido lograr una eficiente delignificación de los RLC, la estabilidad y cristalinidad de la celulosa representan una dificultad extra, aún no resuelta, a la hora de llevar a cabo la hidrólisis enzimática (sacarificación), siendo una barrera para la actividad de las celulasas (Rocha-Martin et al., 2017; Sun et al., 2020; Zhang et al., 2021a, b). Si bien es un proceso limpio y seguro, se convierte en una etapa costosa debido a las altas concentraciones de enzima que se requieren para obtener buenos rendimientos de azúcares fermentables. Teniendo en cuenta estas dificultades, resulta relevante encontrar alternativas que permitan aumentar la biodisponibilidad de la celulosa, mejorando así la eficiencia de la sacarificación. La cavitación (tanto acústica, por ultrasonido, como hidrodinámica) se ha convertido en una de las tecnologías que atraen gran atención dada su capacidad para inducir una intensificación energética eficiente en diversos procesos físicos y químicos (Zheng et al., 2022). Se ha propuesto que la cavitación es capaz de desarmar la matriz lignocelulósica, promoviendo una delignificación a baja temperatura, pudiendo, además, reducir la cristalinidad de la celulosa y mejorar la accesibilidad de las enzimas a las fibras (Verdini et al., 2021). En particular, la cavitación hidrodinámica (HC) se ha empleado en

numerosos procesos industriales y representa un medio económico que permite lograr un escalado en procesos que pueden ser asistidos por ultrasonido, el cual es mucho más costoso en términos energéticos (Su et al., 2020; Wu et al., 2019). Sin embargo, en comparación con otras tecnologías emergentes (como microondas y ultrasonido), el uso de HC como método de pretratamiento ha sido escasamente investigado, a pesar de los buenos resultados reportados hasta ahora (Sun et al., 2022). En este contexto, uno de los objetivos principales de esta tesis es analizar el efecto de aplicar HC combinada con la hidrólisis ácida-oxidativa de RLC sobre la posterior hidrólisis enzimática.

En línea con la búsqueda de procesos de intensificación de las etapas de pretratamiento, se decidió analizar el efecto de interponer un mezclador estático de contracción-expansión (CE) durante el proceso de lavado de los RLC posterior a la hidrólisis ácida-oxidativa. Los mezcladores estáticos son dispositivos que permiten la mezcla continua dentro de sistemas tipo tubería sin necesidad de partes móviles, y tienen muchas ventajas en comparación con los reactores agitados, como su diseño compacto, bajo costo relativo, ausencia de partes móviles, baja pérdida de carga, y excelente contacto entre fases (Alekseev et al., 2020; Cavatorta et al., 1999; Myers et al., 2018). En el caso de los mezcladores estáticos de tipo CE, se ha evidenciado que pueden romper flóculos suspendidos en procesos de tratamiento de aguas residuales basados en coagulación-floculación-sedimentación, debido a la turbulencia que se genera (Fleite et al., 2020). Si bien no resultaron convenientes para mejorar las características de los flóculos porque inducían su desintegración total, pueden ser útiles con otros fines. Considerando este resultado, se estimó que el empleo de un mezclador de CE durante el proceso de lavado de los RLC delignificados podría contribuir a la disgregación de las fibras de celulosa, facilitando la posterior hidrólisis enzimática. En consecuencia, se procedió a diseñar un mezclador de CE utilizando herramientas computacionales para simular la dinámica de fluidos dentro del sistema buscando condiciones que maximicen la turbulencia (Li et al., 2025), construir luego el prototipo diseñado y estudiar su aplicabilidad para mejorar la biodisponibilidad de la celulosa que surge de los RLC. En particular, el objetivo específico dentro de la tesis es analizar si el empleo del mezclador estático de CE diseñado durante el proceso de lavado de los RLC delignificados tiene efecto sobre la posterior hidrólisis enzimática. También se busca estudiar la factibilidad de realizar la sacarificación en recirculación empleando el mezclador de CE como promotor de la turbulencia.

Por otro lado, diversos estudios han investigado el uso de aditivos para mejorar la eficiencia de la sacarificación enzimática (Liu et al., 2025; Lou et al., 2018; Rocha-Martin et al., 2017; Sánchez Muñoz et al., 2022; Xin et al., 2017). En particular, se ha evidenciado que los surfactantes pueden mejorar significativamente la eficiencia de la hidrólisis enzimática. Sin embargo, en la literatura se encuentran muchos resultados contradictorios, y las razones que conducen a una mayor eficiencia no están del todo claras. La información relacionada con el efecto de la estructura del sustrato o el método de pretratamiento sobre los efectos de los surfactantes es limitada. A partir de un análisis de la bibliografía disponible, se infiere que todavía no existe certeza sobre los efectos beneficiosos reales que se pueden obtener con la adición de surfactantes. Por lo tanto, es relevante obtener más información experimental relacionada con el efecto de diferentes surfactantes sobre la sacarificación de la celulosa y de los RLC delignificados. Durante el desarrollo de esta tesis se planteó como objetivo específico analizar las influencias de utilizar varios surfactantes no iónicos sobre el rendimiento de glucosa obtenido a partir de papel de filtro. Además, se buscó examinar el efecto de utilizar surfactantes sobre la hidrólisis enzimática de la carboximetilcelulosa, con el fin de analizar si hay influencia de la estructura del sustrato celulósico. Por otro lado, la información disponible sobre el efecto de los surfactantes no iónicos sobre una biomasa pretratada es limitada. Por lo tanto, también se analiza el efecto de añadir surfactantes no iónicos durante la hidrólisis enzimática de dos RLC delignificados mediante la hidrólisis ácida-oxidativa.

En resumen, el objetivo general de este trabajo de tesis es proponer y analizar estrategias que permitan intensificar la sacarificación de residuos lignocelulósicos con el fin de contribuir a incrementar desarrollos tecnológicos que empleen dichos residuos como recursos renovables para la elaboración de productos y de energía.

Este objetivo general se abordó a partir del desarrollo de los siguientes objetivos específicos:

- Análisis crítico de la relevancia de emplear surfactantes no-iónicos como aditivos durante la hidrólisis enzimática de celulosa y de RLC delignificados con el fin de intensificar este proceso
- Estudio de la factibilidad de utilizar cavitación hidrodinámica durante la etapa de lavado posterior a una hidrólisis ácida-oxidativa que permita una eficiente delignificación de RLC (proceso HPAC), como método de intensificación de la sacarificación de dichos

residuos. Comparación con resultados que surgen de trabajar con sustratos modelo (celulosa y carboximetil celulosa).

- Estudio de la importancia de utilizar un mezclador estático de contracción-expansión como promotor de turbulencia durante la etapa de lavado posterior al proceso HPAC, como método de intensificación de la sacarificación de RLC. Comparación con resultados que surgen de trabajar con sustratos modelo (celulosa).

La organización del documento involucra seis capítulos. Un primer capítulo en el cual se analizará la bibliografía de los temas relacionados con las actividades que se llevaron a cabo en la tesis en relación con los objetivos específicos propuestos. Luego, se presenta un segundo capítulo que describe los materiales utilizados y los procedimientos y procesos empleados. A continuación, se presentan los resultados del trabajo realizado en relación a los objetivos específicos en los capítulos 3 a 5. Finalmente, en el capítulo 6 se resumen las conclusiones que se alcanzaron a partir de los resultados presentados y el análisis de los mismos.

Capítulo 1 : Revisión bibliográfica

En este capítulo se realiza una extensa revisión de antecedentes bibliográficos, con énfasis en los temas relacionados con los objetivos específicos de la tesis. En primer lugar, se incluye una sección breve sobre la importancia de la delignificación como método de pretratamiento indispensable para mejorar la eficiencia de la sacarificación, indicando la razón que nos llevó a utilizar el procedimiento de hidrólisis ácida-oxidativa que utiliza ácido acético y peróxido de hidrógeno (HPAC). Cabe remarcar que en esta tesis no se estudia en particular dicho método porque fue parte de un trabajo previo (Kildegaard et al., 2022) sobre el cual nos basamos para seleccionar las condiciones que utilizamos en la hidrólisis de los RLC. De todos modos, para una correcta interpretación de los resultados y de los procedimientos desarrollados, es relevante resaltar algunos aspectos de la constitución de la lignina y como eliminarla de los RLC.

Luego, se presenta una revisión asociada a las estrategias de intensificación estudiadas. Por un lado, se abordan los principales aspectos de la hidrólisis enzimática, con énfasis en el impacto del uso de surfactantes no iónicos como aditivos para mejorar la eficiencia del proceso. Por el otro, se presentan los principios fundamentales de la cavitación, los parámetros que influyen en su eficiencia, y sus aplicaciones en el tratamiento de biomasa para la producción de azúcares fermentables. Asimismo, se discuten los fundamentos y aplicaciones de los mezcladores estáticos en el contexto de la optimización de estos procesos. Esta revisión permitirá contextualizar los objetivos y metodologías adoptadas en el presente estudio, contribuyendo al desarrollo de estrategias sostenibles para el aprovechamiento de los RLC.

1.1 Delignificación de los RLC

1.1.1 Características generales de los RLC

Cada año, los sectores agrícola y agroforestal generan grandes cantidades de residuos lignocelulósicos (RLC) como resultado de sus actividades. Se estima que su producción global asciende aproximadamente a 140 gigatoneladas anuales, planteando un desafío considerable en términos de gestión y aprovechamiento (Devi et al., 2023). Generalmente, estos residuos son incinerados o simplemente desechados, lo que contribuye a la contaminación del aire y al deterioro de la calidad del suelo y los recursos hídricos.

No obstante, los residuos lignocelulósicos poseen un enorme potencial como recurso natural renovable, de bajo costo y abundante, con aplicaciones en bioenergía y en la obtención de múltiples productos de valor. Los procesos aplicables a los RLC en una biorrefinería se resumen en la **Figura 1.1**. La conversión de los RLC en energía es un enfoque innovador para la valorización y gestión de residuos, mitigando simultáneamente la contaminación ambiental (Velvizhi et al., 2022). La reutilización de los RLC es una alternativa atractiva para la disminución de residuos en áreas urbanas (Ahmed et al., 2019) o sectores agrícolas (Alves-Ferreira, 2021) y forestales (Lee et al., 2021).

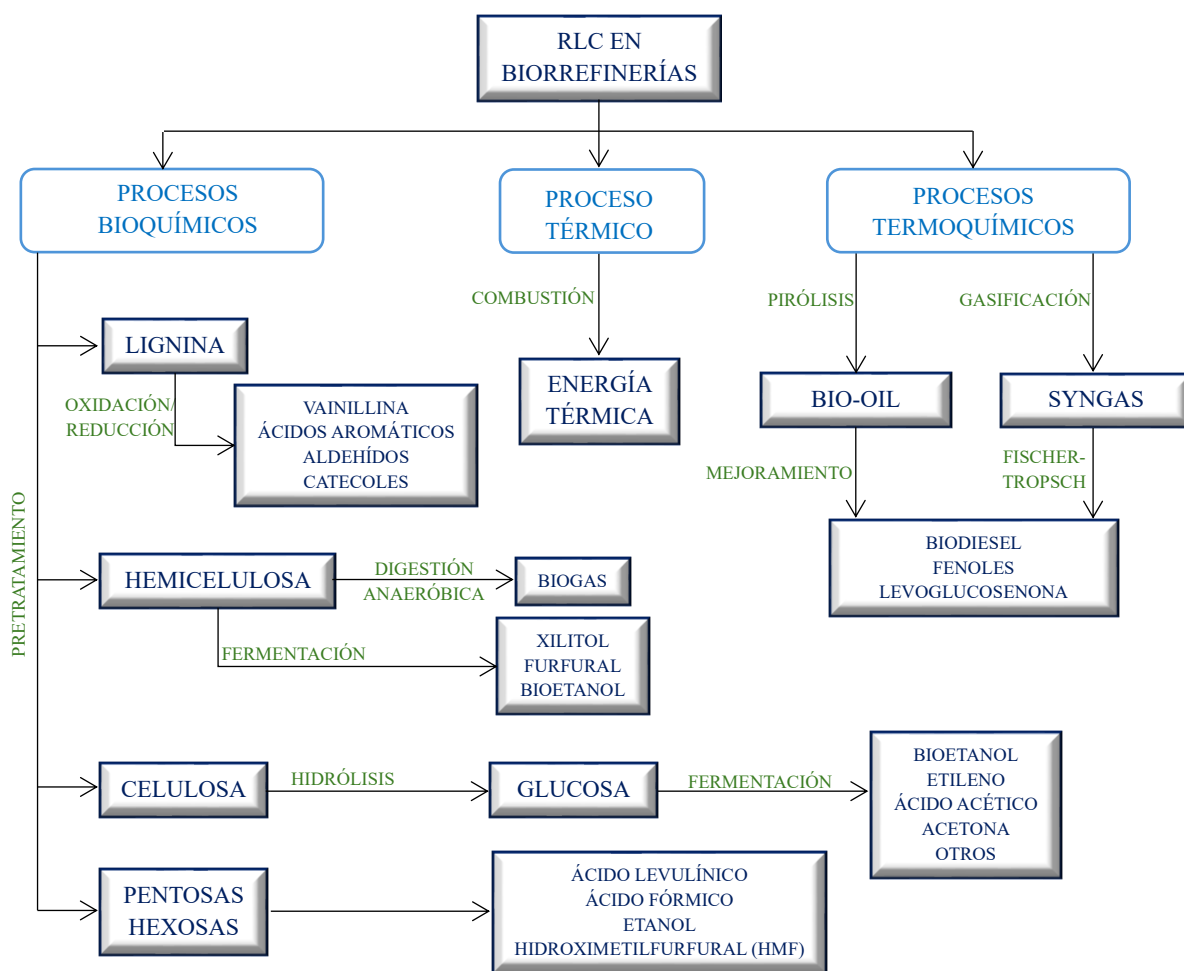


Figura 1.1. Vías de conversión de los RLC en una biorrefinería y algunos productos que se pueden obtener a partir de ellos. Reformulado a partir de Saini et al. (2022).

El material lignocelulósico está formado por tres componentes principales (**Figura 1.2**): celulosa (30-50%), hemicelulosa (10-35%) y lignina (10-35%). Estas proporciones varían de acuerdo al tipo de biomasa, a la especie, e incluso debido a la edad del cultivo o el momento en el cual fue recolectado, pero se encuentran generalmente dentro de los rangos descritos. La celulosa y las hemicelulosas (holocelulosa) suelen constituir aproximadamente el 70% de la biomasa total y están fuertemente unidas a la lignina por enlaces covalentes y puentes de hidrógeno, lo que confiere a la estructura una gran resistencia (Bueno Moron et al., 2025; Limayem y Ricke, 2012; Sun et al., 2023). La fracción de holocelulosa de los RLC, que se obtiene luego de eliminar la lignina, puede convertirse en azúcares simples a través de una hidrólisis enzimática (sacarificación). La sacarificación requiere desarmar esta matriz compleja para que haya contacto de la enzima (celulasas) con el sustrato celulósico (Abolore et al., 2024); por lo tanto, eliminar de manera eficiente la lignina que protege las fibras de celulosa promueve significativamente la posterior hidrólisis enzimática (Ascencio et al., 2025; Li et al., 2024; Saini et al., 2016; Wang et al., 2024).

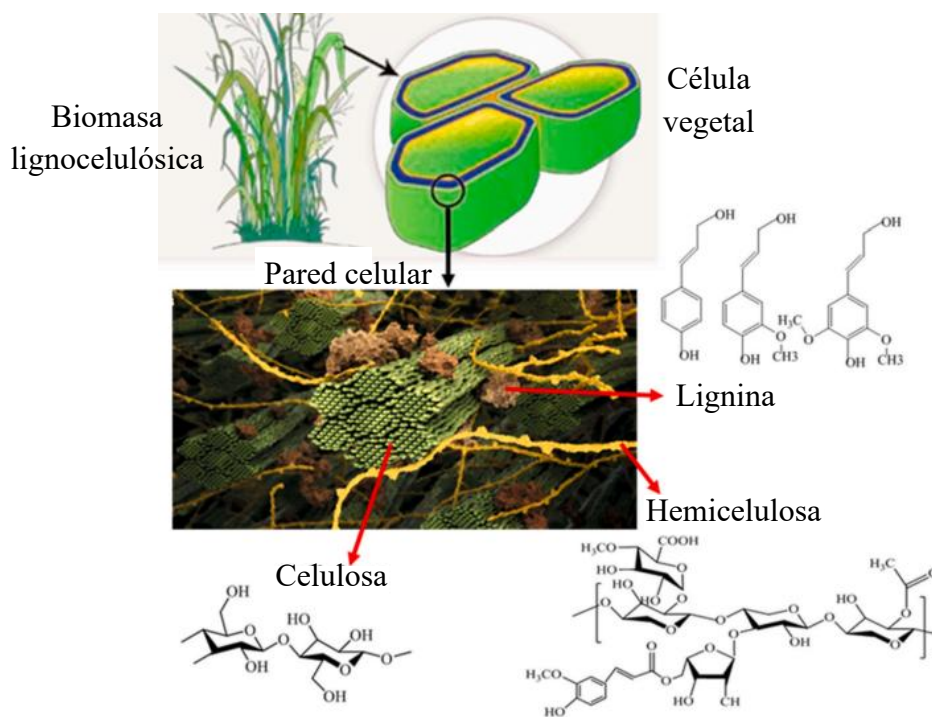


Figura 1.2. Composición y estructura de la biomasa lignocelulósica (Zhang et al., 2021a).

La lignina es un heteropolímero que se encuentra en la pared celular del tejido vascular de las plantas, aportándoles rigidez, sostén estructural (Maceda et al., 2021), y protección contra hongos celulolíticos (Ninkuu et al., 2022). A diferencia de otros polímeros naturales como la celulosa y las proteínas, la lignina no tiene una definición estructural tan precisa debido a la diversidad de sus unidades estructurales, las cuales no siguen un patrón de repetición regular. Además, su composición y estructura pueden variar en función de su origen y del método empleado para su extracción o aislamiento (Chávez-Sifontes et al., 2013; Maceda et al., 2021). La lignina está compuesta por tres principales monómeros fenilpropanoides (monolignoles): alcohol *p*-cumarílico (*p*-hidroxifenilo), coniferílico (guayacilo) y sinapílico (siringilo) (**Figura 1.3**). También se consideran como monómeros estructurales a monolignoles acetilados (ésteres de coniferilo y ésteres de sinapilo), hidroxicinamatos (ácido *p*-cumárico, ferulato y sinapato), coniferaldehído, sinapaldehído, ácido ferúlico y alcohol 5-hidroxiconiferaldehído.

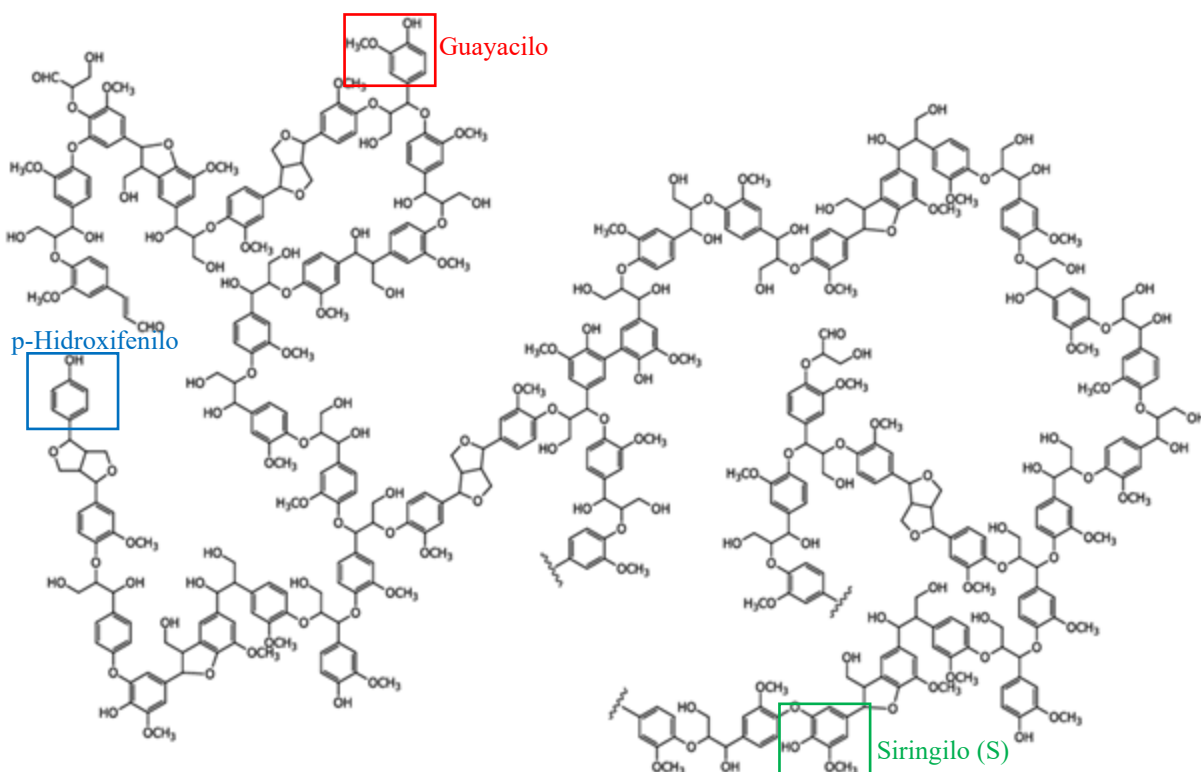


Figura 1.3. Modelo estructural de la lignina de madera. Reformulado a partir de Chávez-Sifontes et al. (2013).

La obtención eficiente de azúcares fermentables a partir de los RLC requiere de un tratamiento previo para eliminar la lignina (delignificación). La delignificación es una etapa fundamental para alterar la estructura recalcitrante de la lignocelulosa y aumentar la disponibilidad de la holocelulosa para la posterior hidrólisis (Vu et al., 2020). Los pretratamientos químicos con soluciones ácidas o alcalinas, solventes orgánicos y líquidos iónicos mejoran la degradación enzimática subsiguiente de la celulosa al separar la lignina (Hassan et al., 2018), disminuyendo además la cristalinidad del componente celulósico en la biomasa (Vu et al., 2020).

Los procesos tradicionales de delignificación utilizados en la extracción de celulosa para la producción de papel, y los métodos que emplean ácidos y álcalis fuertes, no son adecuados para generar un sustrato biodisponible para la fermentación (Aditiya et al., 2016). Los pretratamientos clásicos con ácidos diluidos y procesos que requieren vapor de agua, como la explosión de vapor, necesitan altas temperaturas, y la lignina remanente sigue dificultando el acceso a las fibras de celulosa (Hassan et al., 2018). Además, las altas temperaturas y los pH extremos favorecen la formación de ácidos alifáticos y furanos (Jiménez-Gutiérrez et al., 2021), que son inhibidores de las celulasas (Sheng et al., 2021) y tóxicos para los microorganismos fermentadores (Jönsson et al., 2013; Muaaz-Us-Salam et al., 2020). Por lo tanto, el desarrollo de pretratamientos a bajas temperaturas es crucial para reducir el consumo de energía y evitar la producción de inhibidores de la actividad enzimática y fermentativa (Song et al., 2019).

La mezcla altamente oxidante de peróxido de hidrógeno y ácido acético (HPAC) se ha sugerido como un pretratamiento de baja temperatura con alta eficiencia en la eliminación de lignina y reducción de la cristalinidad de la holocelulosa (Mota et al., 2019), lo que permite incrementar significativamente la recuperación de azúcares fermentables (Meng et al., 2022; Wi et al., 2015).

1.1.2 Hidrólisis ácida-oxidativa

La hidrólisis ácida-oxidativa de los RLC es un proceso de delignificación que se lleva a cabo con una mezcla de peróxido de hidrógeno y ácido acético glacial (HPAC) que, bajo determinadas condiciones de operación, permite depolimerizar parcialmente y solubilizar la lignina. Este método de delignificación utiliza reactivos que se descomponen en compuestos inocuos y genera un sustrato que mejora la productividad de los azúcares mediante tratamientos enzimáticos y biológicos (Mota et al., 2019; Wi et al., 2015; Zhou et al., 2023). Distintas proporciones de la

mezcla HPAC han sido empleadas en diversos estudios a fin de analizar su eficiencia en la remoción de lignina para varios RLC. Del mismo modo, las condiciones de operación como la temperatura, la agitación y tiempo de reacción son variables comúnmente estudiadas a fin de encontrar aquellas que conduzcan a los mayores rendimientos asociados a la remoción de lignina y recuperación de holocelulosa. En los últimos años, se han publicado artículos que analizan la efectividad de la hidrólisis ácida-oxidativa sobre distintos RLC y bajo diversas condiciones.

Kuznetsov et al. (2002) implementaron el proceso de hidrólisis ácida-oxidativa con el objetivo de delignificar chips de madera de álamo y abate. En este caso, los mayores rendimientos se observaron para una relación molar $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CH}_3\text{COOH}$ de 0,3 con el agregado de H_2SO_4 2% p/p respecto a la masa seca de la madera, llevando a cabo la reacción a 130°C durante 3 h en un reactor sin agitación con una relación sólido/líquido de 0,2. Bajo estas condiciones, se obtuvo una recuperación del 86,6% en peso de la celulosa para el caso del álamo y del 70% para el abate. Estos rendimientos se vieron aumentados al incluir catalizadores (TiO_2 , Na_2MoO_4) durante el proceso.

Por su parte, Tan et al. (2010) analizaron los rendimientos de la delignificación con HPAC de bagazo de caña de azúcar y su efecto sobre la posterior sacarificación enzimática. Como licor de digestión emplearon soluciones acuosas con distintas proporciones de una mezcla equivolumétrica de H_2O_2 al 30% y ácido acético glacial. Las hidrólisis se realizaron con una relación sólido/líquido de 125 g/L. Al aumentar la concentración de HPAC, aumentó la remoción de lignina al cabo de 24 h de reacción. Sin embargo, observaron que el efecto de la temperatura fue mayor que el que tiene la concentración de HPAC, alcanzándose un 97% de eliminación de la lignina con un licor que tenía un 69,1% de HPAC, cuando la reacción se lleva a cabo a 80°C durante 26,5 h. Para estas condiciones de reacción, lograron recuperar un 68% de hemicelulosas. Posteriormente, el sólido obtenido condujo a conversiones -de carbohidratos a azúcares- mayores al 95% luego de 48 h de sacarificación enzimática en contraste con el casi 11% que se obtiene para el bagazo sin pretratamiento.

Wi et al. (2015) estudiaron la hidrólisis ácida-oxidativa en contraposición a tratamientos con otros solventes como H_2SO_4 , CH_3COOH , H_2O_2 , ácido peracético, y distintas mezclas de ellos. Los sustratos elegidos para hacer el análisis fueron paja de arroz, madera de pino y madera de roble. Como indicadores de la eficiencia del tratamiento, midieron el porcentaje de lignina soluble y de

holocelulosa en los sólidos, y la conversión de las posteriores sacarificaciones y fermentaciones para obtener etanol. Se estudiaron distintas relaciones volumétricas de H_2O_2 y CH_3COOH , alcanzándose los mayores rendimientos de glucosa durante la sacarificación de aquellas muestras que fueron tratadas con mezclas equivolúmetricas durante el pretratamiento. Para todos los sustratos, el tratamiento con HPAC fue el que condujo a los mayores rendimientos de azúcares en las sacarificaciones, siendo significativamente más efectivo para las maderas que para la paja de arroz. La temperatura y el tiempo de reacción fueron dos variables estudiadas, encontrándose que los rendimientos en las sacarificaciones aumentan con estas. Se halló, además, que una vez que se superan las 2 h de digestión, los efectos sobre la sacarificación son menores. Lo mismo ocurre una vez que la temperatura alcanza los 80°C . Realizando las delignificaciones en estas condiciones, el porcentaje de lignina disminuye en un 85% para la paja de arroz y en un 98% para el caso de las maderas. A su vez, se observa que el contenido de holocelulosa no disminuye apreciablemente por el tratamiento, lo que indica que la hidrólisis con HPAC tiene una buena selectividad en la remoción de lignina. Otra ventaja que presenta este proceso frente a las hidrólisis ácidas es que, debido a las condiciones suaves de la hidrólisis ácida-oxidativa, se evitan la degradación de los monosacáridos a furfural y a 5-hidroximetilfurfural (HMF), que son tóxicos para los microorganismos fermentadores.

Mota et al. (2019) realizaron la digestión de paja de maíz, bagazo de caña de azúcar y corteza de Eucalipto con mezclas equivolúmetricas de HPAC durante 2 h y a 80°C , con una relación sólido/líquido de 100g/L. La remoción de lignina alcanzó un 45% para la paja de maíz, un 70% para el bagazo y un 75% para el Eucalipto. En contraposición, el porcentaje de celulosa cristalina aumentó en todos los casos, mientras que la hemicelulosa sólo disminuyó (en un 8%) para el bagazo. Las posteriores hidrólisis enzimáticas se vieron positivamente afectadas debido al pretratamiento con HPAC. La generación de azúcares reductores aumentó para todos los sustratos pretratados con respecto a aquellos sin tratamiento, siendo el efecto mucho más significativo para el Eucalipto (unas 20 veces, frente a 7 para el bagazo y 2 para la paja de maíz). Esto puede deberse a que la adsorción de la enzima también se ve favorecida en mayor medida para el Eucalipto que para los otros sustratos delignificados. En cuanto a la generación de inhibidores durante la hidrólisis ácida-oxidativa, no detectaron acumulación de furfural ni de HMF en el licor; incluso realizaron experimentos con estándares de furfural y HMF para verificar si el HPAC es capaz de

degradar estos compuestos, alcanzándose la degradación completa de los mismos luego de 40 min de incubación.

Meng et al. (2022) estudiaron el pretratamiento con HPAC sobre residuos de bambú. Como licor de tratamiento emplearon mezclas equivolúmetricas H_2O_2 y ácido acético, con un 0,5% p/p de H_2SO_4 como catalizador. El tratamiento fue realizado durante 2 h y a 60°C , lográndose una remoción de lignina de entre el 70% y el 85%. Luego, las muestras sacarificadas condujeron a mayores rendimientos de azúcares fermentables (entre 71% y 84%) que aquellas que fueron delignificadas por otros procedimientos como la hidrólisis ácida con H_2SO_4 , la hidrólisis alcalina con KOH y el tratamiento hidrotérmico (que en el mejor de los casos condujo al 20,5%).

Todos los estudios presentados sugieren que el HPAC es útil para alcanzar altos grados de remoción de lignina y altos porcentajes de recuperación de holocelulosa, sin requerir condiciones demasiado severas de operación. Los resultados son significativamente más positivos para las maderas que para los otros sustratos analizados. Además, la hidrólisis con HPAC reduce la generación de compuestos tóxicos que surgen de la oxidación de los azúcares y pueden inhibir a las enzimas y microorganismos utilizados en la sacarificación y la fermentación posteriores.

1.2 Hidrólisis enzimática

La obtención de azúcares fermentables a partir de los polisacáridos presentes en los RLC puede llevarse a cabo mediante hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática. Esta última es considerada más segura y ecológica debido a sus condiciones más suaves, menores requerimientos energéticos y baja generación de residuos (Rocha-Martin et al., 2017; Saini et al., 2022). Sin embargo, la cristalinidad y estabilidad de la celulosa lo convierten en un proceso complejo, requiriendo altas dosis de enzima que lo vuelven costoso (Baski et al., 2023; Guo et al., 2018). Por estos motivos es de gran importancia encontrar alternativas que permitan mejorar la eficiencia de este proceso.

1.2.1 Cocteles enzimáticos de celulasas

La estructura de la biomasa lignocelulósica es muy compleja, por lo que se requieren variadas enzimas y proteínas para una eficiente sacarificación (Adsul et al., 2020). Las celulasas son las enzimas capaces de descomponer la celulosa y algunos polisacáridos asociados para producir

azúcares fermentables. Las celulasas incluyen distintas enzimas que tienen mecanismos de acción específicos sobre los poli y oligosacáridos. Entre ellas, se encuentran las endoglucanasas, las celobiohidrolasas y las β -glucosidasas. Las endoglucanasas hidrolizan aleatoriamente los enlaces β -1,4-glucosídicos internos de la celulosa cristalina, generando oligosacáridos de diferentes longitudes. Las celobiohidrolasas atacan desde los extremos libres de las cadenas de celulosa, generando celobiosa. Por su parte, las β -glucosidasas producen glucosa a partir de la hidrólisis de la celobiosa (Saini et al., 2022; Zheng et al., 2021). La **Figura 1.4** esquematiza el mecanismo de acción de estas enzimas sobre la biomasa lignocelulósica.

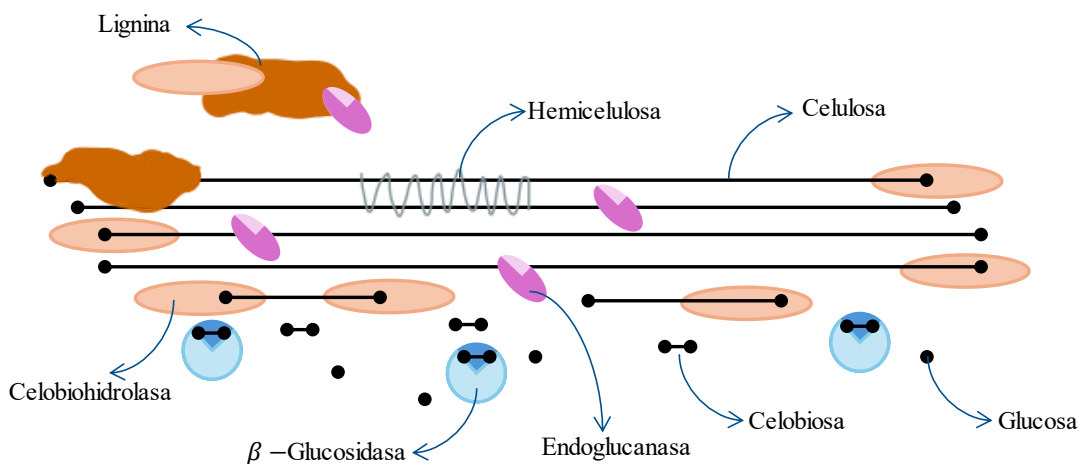


Figura 1.4. Mecanismos de acción de las distintas celulasas sobre la biomasa lignocelulósica. Reformulado a partir de Zheng et al. (2021).

Además de las celulasas, existen otros grupos de enzimas que permiten aumentar la producción de azúcares fermentables a partir de RLC (Adsul et al., 2020; Saini et al., 2022). Las hemicelulasas son las encargadas de generar monosacáridos de la hemicelulosa. Las monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs) son consideradas enzimas accesorias encargadas de la hidroxilación de la celulosa (Singhania et al., 2021).

Todas estas enzimas actúan de manera sinérgica para lograr una degradación eficiente de la celulosa en glucosa (Zheng et al., 2021). Generar una mezcla equilibrada de enzimas celulolíticas es esencial para que la hidrólisis enzimática sea eficiente (Adsul et al., 2020; Saini et al., 2022). Actualmente se dispone de una gran variedad de cocteles comerciales que combinan distintas enzimas celulolíticas, logrando una eficiencia superior en comparación con el uso individual de cada enzima (Yang et al., 2023). La eficiencia de estos cocteles depende de diversos factores, como

el pH, la temperatura y el tiempo de residencia, limitaciones de transferencia de masa, y el uso de aditivos (Baksi et al., 2023; Yang et al., 2023).

1.2.2 Surfactantes no iónicos como aditivos en la sacarificación

Numerosos estudios han analizado la utilización de surfactantes como aditivos para mejorar la eficiencia de la sacarificación. Las razones por las que se cree que puedan tener efectos positivos son diversas, e incluso no hay consenso sobre el efecto que generan (Zheng et al., 2021).

Yu et al. (2018) han demostrado que los surfactantes catiónicos pueden mejorar la conversión en la hidrólisis enzimática de fibras de papel de desecho desentintadas mediante flotación alcalina, las cuales contienen principalmente celulosa con carga negativa. Los autores argumentan que, durante el proceso de producción de pulpa, los grupos hidroxilo ($-OH$) y los extremos reductores de la celulosa, así como los grupos carbonilo de la lignina, se oxidan a grupos carboxílicos ($-COOH$), que tendrían carga negativa al pH de la hidrólisis enzimática. Por lo tanto, un surfactante catiónico tendría un efecto positivo al prevenir la repulsión electrostática entre la celulosa y la enzima, mejorando la adsorción de la celulosa en el polímero.

No obstante, la mayoría de los estudios sobre la influencia de aditivos han destacado la mejora obtenida en la sacarificación de celulosa y de RLC pretratados al usar surfactantes no iónicos (Sánchez-Muñoz et al., 2022). Por ejemplo, Pallapolu et al. (2020) probaron el efecto de agregar polímeros no iónicos (polivinilpirrolidona, PVP; polietilenglicol, PEG; y alcohol polivinílico) y polímeros iónicos (poliacrilamida catiónica y polietilenimina) en la hidrólisis enzimática de celulosa libre de lignina y dos RLC pretratados (pasto varilla y rastrojo de maíz), concluyendo que los polímeros no iónicos generaron mejoras significativamente mayores en la digestibilidad del glucano.

Hsieh et al. (2015) encontraron que el efecto del PEG como aditivo en la hidrólisis de celulosa variaba según el tipo de enzima, siendo particularmente beneficioso para potenciar las celobiohidrolasas (CBH) y con casi ninguna influencia en las endoglucanasas (EG) o β -glucosidasas. Los cócteles enzimáticos comerciales generalmente contienen mezclas con un alto porcentaje de CBH. Los autores también argumentaron que podría haber un efecto relacionado con las interacciones PEG-agua, ya que la adición de PEG promovería la movilidad del solvente, como se infiere de los valores aumentados del tiempo de relajación spin-spin T_2 .

Lou et al. (2018) encontraron que, en condiciones de enzimas diluidas y baja carga de sólidos, la actividad enzimática está fuertemente influenciada por el estrés hidrodinámico, ya sea por la agitación mecánica o por la presencia de una interfaz gas-líquido. Mostraron que, en esas condiciones, la adición de surfactantes no iónicos protege significativamente la actividad enzimática. Estos autores también estudiaron la adsorción de celulasa sobre la celulosa y observaron que ésta se modifica solo ligeramente en presencia de PEG4600; por lo tanto, concluyeron que los surfactantes no iónicos no mejoran la hidrólisis enzimática de la celulosa debido al aumento de la adsorción de celulasa sobre ella.

Chen et al. (2018) encontraron que el aumento en la digestibilidad enzimática obtenido con la adición de Tween 20 en la hidrólisis de paja de trigo pretratada con ácido diluido fue significativo para todas las velocidades de agitación, pero mayor a 100 y 200 rpm en comparación con 150 rpm. También reportaron que la adición del surfactante no iónico incrementó progresivamente la digestibilidad para cargas de sólido entre 3 y 10% p/p, y amplió la ventana óptima de pH. El aumento en el rendimiento de la hidrólisis debido al efecto del surfactante fue mayor fuera del rango de pH 4,8-5,0, igualando casi la digestibilidad obtenida para un pH entre 4,5 y 5,5. Con lo cual, concluyen que el efecto del agregado de Tween 20 durante la sacarificación depende de las condiciones a las que se produce la misma, y parece ser más significativo en condiciones más severas. Por otra parte, estos autores encontraron un fuerte efecto inhibitorio del Tween 20 en la hidrólisis enzimática de papel de filtro. Sin embargo, la adición de Tween 20 al papel de filtro mezclado con diferentes tipos de lignina tuvo siempre un efecto positivo en la digestibilidad enzimática.

Zhou et al. (2015) también informaron una influencia negativa de los surfactantes no iónicos en la hidrólisis de celulosa microcristalina pura cuando el surfactante se añadió en altas concentraciones. Los autores concluyeron que el efecto del surfactante en la hidrólisis de celulosa depende de la estructura de la celulosa, las condiciones de hidrólisis y la formulación del cóctel enzimático.

Zong et al. (2015) encontraron que la sacarificación de polvo de celulosa cristalina pura usando PEG como surfactante mostró una menor mejora en la velocidad de reacción y en la conversión que las alcanzadas al usar rastrojo de maíz pretratado como sustrato. También reportaron que mezclar PEG con la enzima antes de la sacarificación del rastrojo de maíz no mostró ninguna

mejora. En contraste, premezclar el sustrato con PEG generó la misma mejora que mezclar todo en el inicio.

Zhang et al. (2021b) reportaron el efecto beneficioso de usar Tween 80 para aumentar significativamente el rendimiento de glucosa y reducir el tiempo de hidrólisis enzimática del bagazo de caña pretratado con etanol catalizado por NaOH. Los autores indicaron que se podría alcanzar un rendimiento de glucosa de aproximadamente el 90% con la mitad de la dosis de enzima al agregar Tween 80 y reducir el tiempo de hidrólisis en un ~67%. En la misma línea, Lv et al. (2022) reportaron una influencia positiva similar de Tween 80 en el rendimiento de glucosa del bagazo de caña pretratado con etilenglicol catalizado por HCl. Ying et al. (2021a) también evidenciaron las ventajas de usar Tween 80 para mejorar la disponibilidad de glucosa en álamo pretratado con un método combinado de ácido diluido más oxidación ácida. Estos resultados pueden tener relación con lo reportado por Xu et al. (2015), logrando soluciones de agua+Tween 80 capaces de disolver la lignina.

En conclusión, aunque la influencia de los surfactantes no iónicos ha sido ampliamente estudiada, aún existen inconsistencias e información limitada para determinar con certeza su efecto beneficioso y el mecanismo que lo genera. En los casos en los cuales se hidrolizó celulosa pura, la influencia fue positiva o negativa dependiendo del surfactante utilizado, su concentración, la velocidad de agitación o el área interfacial gas-líquido. Por lo tanto, en esta tesis se buscó determinar las influencias de estas variables en el rendimiento de glucosa obtenido a partir de papel de filtro, utilizando varios surfactantes no iónicos para comparar con resultados reportados. Además, se estudió el efecto sobre la hidrólisis enzimática de la carboximetilcelulosa, con el fin de analizar el efecto en un sustrato celulósico con una estructura diferente en medio homogéneo.

Por otro lado, la información disponible sobre el efecto de los surfactantes no iónicos en la sacarificación de RLC pretratados es limitada. Se ha estudiado en diferentes precursores con distintos métodos de pretratamiento, resultando generalmente en una influencia positiva atribuida a la reducción de los efectos inhibitorios de la lignina o de compuestos tóxicos. Por lo tanto, también se estudió el efecto de añadir surfactantes no iónicos en la hidrólisis enzimática de dos RLC (aserrín de *Eucalyptus sp.* y *Platanus acerifolia*) pretratados con HPAC.

1.3 Cavitación hidrodinámica

1.3.1 El fenómeno de la cavitación

La cavitación es un fenómeno caracterizado por la aparición, expansión y posterior colapso de burbujas dentro de un líquido en un intervalo de tiempo muy corto, generalmente de milisegundos, dado por una súbita caída en la presión (Wang et al., 2021). Los cambios abruptos en la interfaz entre el vapor y el líquido generan microchorros que pueden alcanzar velocidades superiores a 150 m/s, acompañados de una presión de impacto que puede llegar hasta 200 MPa (Askarniya et al., 2023). Estos microchorros producen flujos turbulentos localizados y microcirculación, lo que optimiza la transferencia de masa entre las fases gaseosa y líquida, pudiendo potenciar distintas reacciones químicas (Askarniya et al., 2023; Wang et al., 2021). A su vez, al impactar estos microchorros contra la pared opuesta de la burbuja, se producen una serie de ondas de choque que pueden propagarse a velocidades de aproximadamente 2000 m/s. Luego, el colapso del toroide principal da lugar a un conjunto de ondas de choque aún más intensas (Supponen et al., 2015). Además, la implosión de las burbujas genera un elevado esfuerzo de corte en las paredes circundantes, alcanzando valores de hasta 3,5 kPa (Dijkink et al., 2008). Esta fuerza intensa de implosión puede ser capaz incluso de romper los enlaces químicos de diversos compuestos. Las moléculas de agua pueden romperse en diversas especies con un alto poder oxidante, como los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), capaces de reaccionar con los compuestos orgánicos (Podbevšek et al., 2021; Wang et al., 2021). Por esto último, se ha establecido que el agregado de H_2O_2 puede mejorar el efecto de la cavitación debido a una mayor formación de radicales $\cdot\text{OH}$ como consecuencia de la disociación del peróxido de hidrógeno durante el proceso (Wang et al., 2021). Podbevšek et al. (2021) realizaron estudios mediante luminiscencia para ubicar la zona de mayor actividad de los radicales libres formados por cavitación empleando una técnica con luminol, y encontraron que ocurre posterior a la zona de implosión de las burbujas. Wang et al. (2009) demostraron la existencia de una sinergia entre la cavitación hidrodinámica (HC) y el uso de H_2O_2 para la degradación de rodamina B en solución acuosa. Posteriormente esta sinergia en la eficiencia de la HC por agregado de peróxido de hidrógeno para la remoción de compuestos orgánicos fue confirmada por numerosos trabajos (Gagol et al., 2018). Por su parte, Badve et al. (2013) observaron una mejora en la disminución de la DQO (demanda química de oxígeno) de aguas residuales al agregar H_2O_2 durante el tratamiento con HC. Sin embargo, encontraron que existe

una concentración óptima de H_2O_2 , que dependerá de cada caso en particular (tipo de cavitador, contaminante, etc.).

Por otro lado, la cavitación es capaz de generar efectos físicos sobre sólidos debido a las fuerzas de corte extremas producidas durante la implosión e las burbujas. Entre otros, es capaz de afectar suspensiones provocando la disminución de tamaño de partícula y cambios en las propiedades reológicas de suspensiones y soluciones de polímeros (Nagarajan y Ranade, 2022; 2019). Las condiciones de alta presión alcanzadas son capaces de producir pequeñas perforaciones o erosión en superficies sólidas, debido a la emisión de ondas de choque y la formación de un microchorro de alta velocidad que se dirige hacia la superficie del sólido al colapsar la burbuja. Esta erosión podría ayudar en la degradación de materiales química y biológicamente resistentes (Prado et al., 2022).

La cavitación, en lo que a operaciones y procesos se refiere, se puede clasificar en dos tipos, según las causas que la originan (Askarniya et al., 2023, Zheng et al., 2022): la cavitación hidrodinámica (HC), generada por cambios bruscos de la presión del líquido; y la cavitación acústica (AC), generada por ultrasonido. Estas dos son las más empleadas a escala industrial debido a la facilidad de generar las condiciones necesarias para que suceda la cavitación y por su simple operación (Zheng et al., 2022).

La frecuencia de irradiación en la cavitación acústica y el tiempo de recuperación de presión en la cavitación hidrodinámica tienen efectos similares sobre la vida útil de las burbujas y el volumen de cavitación activa. Si bien la AC es ampliamente estudiada por los efectos químicos que puede producir (sonoquímica), la corta longitud de onda del ultrasonido limita significativamente su capacidad de transmisión, lo que dificulta la escalabilidad de la AC y restringe su aplicación a gran escala. Por su parte, la HC es más fácilmente escalable debido a la facilidad de ocasionar perturbaciones de la dinámica de fluidos y al conocimiento disponible de cómo se desarrolla el flujo aguas abajo de las restricciones, siendo incluso posible realizar simulaciones para optimizar el diseño del dispositivo de cavitación. En cuanto al consumo energético, la HC suele requerir menos energía en comparación con la AC, lo que la hace más eficiente (Gogate, 2016). Por estos motivos, en los últimos años, la HC se ha convertido en una alternativa prometedora que supera a la AC en lo referido a sus posibles aplicaciones industriales (Holkar 2019; Thanekar y Gogate, 2019), fundamentalmente relacionada con los costos asociados al escalado del proceso (Agarkoti

et al., 2021a). De todos modos, para ciertos efluentes recalcitrantes como los farmacéuticos, y cuando los volúmenes no son extremadamente grandes, ambos tipos de cavitación son aplicables e igualmente eficientes y convenientes, especialmente en combinaciones híbridas con otros procesos de oxidación avanzados, como el proceso Fenton (Lakshmi et al., 2022).

1.3.2 Características y parámetros relevantes en la cavitación hidrodinámica

La cavitación hidrodinámica es generada por cambios bruscos de presión inducidos por perturbaciones en el flujo que ocasionan cambios en la velocidad en un medio líquido. Puede producirse, por ejemplo, al atravesar una contracción (placa orificio o tubo Venturi), o mediante la rotación de un objeto dentro del líquido (turbinas, hélices), o por inducción de la rotación del líquido por determinadas geometrías (cavitadores tipo vortex) (Agarkoti et al., 2021b; Simpson y Ranade, 2019).

En sistemas de flujo, lo más frecuente es utilizar las contracciones (como el tubo Venturi) para generar aumentos en la velocidad del fluido, por su simplicidad y bajo costo. Siguiendo el principio de Bernoulli (Ecuación 1.1), al atravesar una contracción la velocidad del fluido aumenta a expensas de la presión. En consecuencia, en la zona de mayor velocidad, como en la garganta de un tubo Venturi, se dará la menor presión. Cuando la presión local disminuye por debajo de la presión de vapor del fluido que circula, se forman burbujas de cavitación. Aguas abajo de la contracción, el líquido disminuye la velocidad cuando la sección aumenta y se recupera la presión, comprimiéndose las burbujas y conduciendo a su colapso (**Figura 1.5**). Esto provoca una elevada turbulencia y un aumento local de la temperatura y la presión, resultando en ondas de choque altamente destructivas (Hamidi et al., 2023). La intensidad de la turbulencia depende de cuán grande es la caída de presión en el dispositivo de cavitación, la forma de la contracción y qué tan rápido vuelve a aumentar la presión luego de la contracción.

Según Madison et al. (2017), el tamaño de las burbujas define la intensidad de la cavitación, siendo mayor el efecto cuanto mayor es el tamaño que logran alcanzar las burbujas en la zona de baja presión en la cual se expanden. Estos autores sostienen que un gran número de burbujas de cavitación pueden alterar la estructura de la biomasa al colapsar. Definen la “vida de la burbuja” como un parámetro importante, que puede determinarse a partir de la distancia que recorre la burbuja antes de colapsar. La “vida de la burbuja” es una medida del volumen activo donde la cavitación tiene efecto. De todos modos, la forma de las burbujas también influye sobre la

intensidad de la implosión y las burbujas pequeñas suelen ser más proclives a mantener su forma esférica y ocasionar efectos muy intensos (van Wijngaarden, 2016). Por otro lado, como resultado de la compresión y posterior implosión, la temperatura dentro de la burbuja puede alcanzar valores de 5.000-10.000 K y presiones locales de hasta 1.000 atm (Badve et al., 2013; van Wijngaarden, 2016; Pavlenko, 2024). Esto último genera puntos locales de altas intensidades de energía, siendo condiciones propicias para romper enlaces y/o promover la formación de radicales libres.

$$p_1 + \frac{1}{2}\rho v_1^2 = p_2 + \frac{1}{2}\rho v_2^2 \quad (1.1)$$

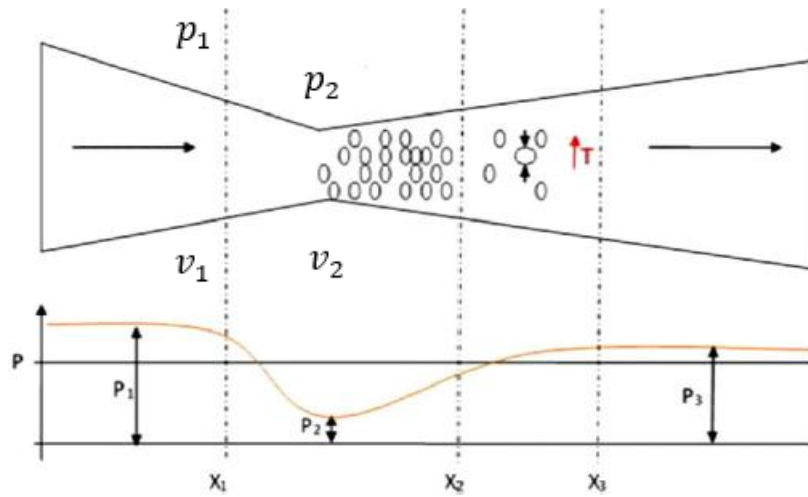


Figura 1.5. Cavitación a través de un tubo Venturi. Gagol et al. (2018).

Al momento de diseñar un dispositivo de cavitación hidrodinámica es importante fijar los parámetros que afectan el proceso. Existe un número adimensional que se ha utilizado ampliamente para caracterizar la cavitación, llamado número de cavitación (C_v), cuya definición más frecuente lo establece como la diferencia entre la presión aguas abajo del dispositivo de cavitación (P_2) y la presión de vapor del líquido a la temperatura de operación (P_v), referido a la presión dinámica ($\frac{1}{2}\rho v^2$) en la garganta (Ecuación 1.2) (Saharan et al., 2012).

$$C_V = \frac{P_2 - P_V}{\frac{1}{2}\rho v^2} \quad (1.2)$$

El número de cavitación, que puede definirse ajustando las condiciones operativas y la geometría del cavitador, es útil para determinar la calidad de la cavitación. Valores bajos de C_V indican mayor probabilidad de que la cavitación ocurra o una cavitación de mayor magnitud. Las condiciones óptimas de cavitación se alcanzan cuando $C_V < 1$, mientras que para valores mayores a 1, las burbujas oscilan en lugar de colapsar, lo que reduce la eficiencia de la cavitación (Hamidi et al., 2023). Bagal y Gogate (2014) aseguran que el rango óptimo de C_V se encuentra entre 0,1 y 1, dado que a menores valores de C_V puede ocurrir coalescencia, formándose burbujas grandes a partir de las pequeñas en lugar del colapso de las mismas.

En sus inicios, se creía que la eficiencia de la cavitación estaba relacionada con el tiempo de tratamiento. Sin embargo, se encontró que, al cambiar la velocidad de circulación del fluido para el mismo tiempo de tratamiento, se obtenían resultados diferentes. En consecuencia, se determinó que la eficiencia de la cavitación depende del número de pasos (N_P) a través del dispositivo (Ranade et al., 2021; Wang et al., 2021). El mismo, para un sistema batch, se define como el cociente entre el caudal volumétrico (Q_V) y el volumen (V) circulante por el sistema, multiplicado por el tiempo (t) de operación (Sarvothaman et al., 2018) (Ecuación 1.3).

$$N_P = \frac{Q}{V} t \quad (1.3)$$

En general, un aumento en el número de pasos conduce a tratamientos más efectivos. Sin embargo, por arriba de determinado número de pasos -según el caso-, esos efectos se vuelven menos significativos. Además, aumentar el número de pasos implica aumentar el tiempo de tratamiento y/o el caudal, lo que conduce a un mayor consumo energético. En consecuencia, es conveniente optimizar el número de pasos en un determinado proceso de cavitación (Nagarajan y Ranade, 2022).

1.3.3 Tipos de dispositivos de cavitación hidrodinámica

Existen distintos tipos de dispositivos de HC que se diferencian por sus características constructivas. En términos generales se los clasifica en estáticos y rotatorios. Como su nombre lo indica, los primeros no tienen partes móviles, siendo más sencillos de fabricar y operar, y con menor tendencia al desgaste del material con el tiempo. Los rotatorios contienen un rotor cilíndrico con hendiduras sobre su superficie (**Figura 1.6 a**). En los cavitadores estáticos la caída de presión es mayor que en los rotatorios, lo que implica un mayor costo energético de bombeo. Sin embargo, los rotatorios tienen otras complejidades asociadas a la operación, dado que, como consecuencia de la rotación del rotor cilíndrico, se genera mayor aumento de la temperatura lo que puede afectar la eficiencia del proceso y podría, incluso, requerir mayores costos de enfriamiento. Además, se trata de dispositivos más complejos y menos estudiados que los estáticos, por lo que son menos utilizados a mayor escala (Carpenter et al., 2016; Hamidi et al., 2023).

Dentro de los cavitadores estáticos se distinguen tres clases: los de placa orificio, los de tubo Venturi, y los tipo vortex (**Figura 1.6 b, c y d**). Si bien todos ellos han sido empleados para intensificar numerosos procesos (Hamidi et al., 2023), el tubo Venturi presenta algunas ventajas frente a los otros, siendo relativamente sencillo de construir y de bajo costo, motivo por el cual fue el dispositivo elegido como intensificador de procesos en esta tesis. Se ha demostrado que generan mayor cantidad de burbujas de cavitación y aumentan la “vida de la burbuja” debido a las secciones suaves convergentes y divergentes. Además, una superficie convergente curva suele conducir a mayor eficiencia de la cavitación (Carpenter et al., 2016).

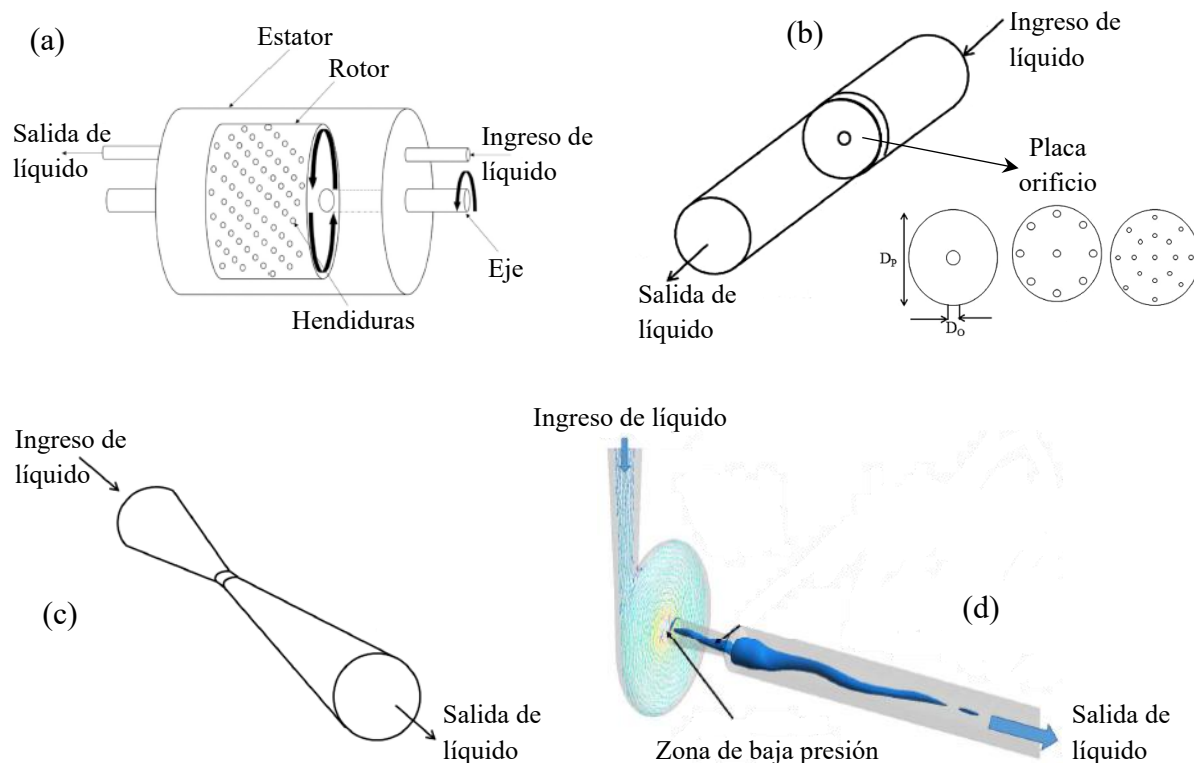


Figura 1.6. Esquema de los distintos dispositivos de cavitación hidrodinámica. (a) Rotatorio, (b) placa orificio, (c) tubo Venturi, (d) vortex. Reformulado a partir de Carpenter et al. (2016), Sarvothaman et al. (2018) y Hamidi et al. (2023).

1.3.4 Procesos intensificados por cavitación hidrodinámica

La cavitación hidrodinámica ha sido empleada de manera eficiente en números procesos. Durante las últimas décadas, la tecnología de HC se ha aplicado ampliamente en el tratamiento de aguas y efluentes para eliminar compuestos bio-refractarios, como colorantes, pesticidas, fármacos, compuestos poliaromáticos, entre otros (Szaja et al., 2022). También se aplica cada vez más para intensificar diversos procesos industriales, como la generación de biocombustibles (Hamidi et al., 2023), la extracción de compuestos bioactivos (Askarniya et al., 2023) y como método de pretratamiento de residuos lignocelulósicos para mejorar la producción de biogás (Naragajan y Ranade, 2019; 2022) y bioetanol (Prado et al., 2024; Teran Hilares et al., 2016; 2017; 2019). Sin embargo, en comparación con otras tecnologías emergentes (como microondas y ultrasonido), el uso de HC como método de pretratamiento ha sido escasamente investigado, a pesar de los buenos resultados reportados hasta ahora (Sun et al., 2022).

Como pretratamiento, la cavitación hidrodinámica (HC) puede aplicarse directamente a los residuos lignocelulósicos o combinarse con otros procesos. Naragajan y Ranade (2019; 2022) trataron directamente bagazo de caña de azúcar con HC para la producción de biogás, logrando aumentos en el rendimiento de biogás superiores al 100% para partículas molidas. El sólido fue recirculado a través del dispositivo de cavitación, y las mejoras se atribuyeron a la mayor biodisponibilidad del material lignocelulósico para el ataque de microorganismos.

Se ha propuesto que la cavitación puede promover una ruptura efectiva de la matriz lignocelulósica con delignificación a bajas temperaturas. Además, puede reducir la cristalinidad de la celulosa y mejorar la accesibilidad de las enzimas a las fibras (Verdini et al., 2021). Ramírez-Cadavid et al. (2016) utilizaron HC para tratar directamente residuos de molinos de maíz, mejorando la etapa subsiguiente de sacarificación enzimática con amilasa para producir etanol, logrando un aumento en la producción de etanol con una dosis significativamente menor de enzimas. Teran Hilares et al. (2016; 2017; 2019) y Madison et al. (2017) combinaron un pretratamiento alcalino para el bagazo de caña de azúcar con HC, lo que resultó en un aumento del rendimiento de glucosa durante la etapa subsiguiente de sacarificación enzimática.

Recientemente, Prado et al. (2022; 2024) extendieron la aplicación a un pretratamiento ácido-oxidativo, combinando un pretratamiento con ácido diluido (sulfúrico, pH= 4-7) intensificado con ozono y HC, asistido con la adición de hierro para promover un proceso avanzado de oxidación tipo Fenton. El bagazo de caña de azúcar pretratado fue luego hidrolizado enzimáticamente para alimentar una fermentación simultánea en reactores interconectados, logrando mayores rendimientos de etanol.

Varios estudios resaltaron la importancia de la proporción sólido/líquido, indicando que una baja carga de sólidos (<5% de sólidos, p/p) llevó a una mayor intensificación (Szaja et al., 2022). Además, la HC también se ha utilizado para intensificar un pretratamiento alcalino con el objetivo de usar fuentes alternativas no madereras para la fabricación de papel (Tsalagkas et al., 2021). Por lo tanto, el uso de HC, ya sea como pretratamiento único o para intensificar otros métodos de pretratamiento, es prometedor para promover la generación rentable de azúcares fermentables.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en esta tesis se decidió aplicar HC durante el proceso de lavado de los RLC luego de la hidrólisis ácida-oxidativa para analizar si es eficiente para intensificar la posterior hidrólisis enzimática del sólido. Como referencia para la comparación, se

analizó el efecto someter al papel de filtro a cavitación hidrodinámica antes de su hidrólisis enzimática.

1.4 Mezcladores estáticos

El mezclado es una operación esencial en la mayoría de los procesos industriales modernos y abarca un amplio rango de aplicaciones en sectores como la industria química, farmacéutica, cosmética, alimentaria, petroquímica, de celulosa y papel, polímeros, procesamiento de minerales y biotecnología (Valdés et al., 2022). Su objetivo principal es reducir la inhomogeneidad de un sistema causada por gradientes de viscosidad, concentración o temperatura, permitiendo así alcanzar condiciones óptimas para cada proceso.

Los componentes a mezclar pueden ser fluidos miscibles o inmiscibles y, dependiendo de la aplicación, el proceso puede involucrar la transferencia de masa, la aceleración de reacciones químicas o simplemente la combinación de sustancias para obtener un producto final homogéneo. En el caso de mezclas líquido-líquido inmiscibles, el desafío radica en la escala de dispersión alcanzada, ya que la generación de gotas finas y la ruptura de la fase dispersa requieren un alto consumo de energía (Li et al., 2025).

Además de ser fundamental para la calidad y el rendimiento de un producto, el mezclado influye en la transferencia de calor y masa, así como en las velocidades de reacción dentro de un proceso. Sin embargo, también representa una parte sustancial del consumo energético industrial, lo que implica importantes costos de operación y capital. Además, se ha comprobado que problemas de mezclado han generado grandes pérdidas económicas a distintas industrias, debido a la obtención de productos que no cumplen con la calidad ni las propiedades deseadas (Valdés et al., 2022). Por lo tanto, optimizar la eficiencia de los procesos de mezcla es crucial para mejorar la sostenibilidad y reducir el impacto económico en la producción industrial.

Los tanques agitados son los dispositivos más comúnmente utilizados para fomentar el mezclado. Se los considera agitadores dinámicos ya que poseen un impulsor giratorio que crea el movimiento del fluido dentro del tanque. Este movimiento produce diferentes fenómenos de mezclado, dependiendo del tipo de impulsor y de las condiciones operativas. Los mezcladores

estáticos han demostrado ser una alternativa atractiva a los tanques agitados convencionales, aunque no han sido tenidos en igual consideración (Valdés et al., 2022).

Los mezcladores estáticos son dispositivos que permiten la mezcla continua dentro de sistemas tipo tubería sin necesidad de partes móviles. Se han utilizado para mezclado líquido-líquido, la dispersión gas-líquido, mezclado sólido-líquido y para facilitar el mezclado y transferencia de masa en reactores químicos (Fleite et al., 2020; Ghanem et al., 2014; Jegatheeswaran et al., 2020; Scala et al., 2020; Schrimpf et al., 2019; Valdés et al., 2022; Wang et al., 2022). Los mezcladores estáticos tienen muchas ventajas en comparación con los tanques agitados, como su diseño compacto, bajo costo relativo, ausencia de partes móviles, baja caída de presión y excelente contacto entre fases. Recientemente, se han aplicado cada vez más para promover la dispersión en sistemas líquido-líquido, ya que pueden generar distribuciones de tamaño de gotas relativamente estrechas debido a la disipación uniforme de energía (Håkansson, 2019; Lebaz et al., 2023; 2022; Lebaz y Sheibat-Othman, 2022; Schrimpf et al., 2019; Valdés et al., 2023; Vikhansky, 2020).

Se han desarrollado y utilizado muchos diseños de mezcladores estáticos para las aplicaciones mencionadas. Un diseño muy simple que ha demostrado ser adecuado para ciertos propósitos es la inclusión sucesiva de contracciones y expansiones (CE) en la tubería. Los dispositivos CE han demostrado mejorar la mezcla de líquidos miscibles e inmiscibles (Hoang et al., 2018; Lü et al., 2016; Yıldırım, 2017; Zhang et al., 2022), particularmente, pero no exclusivamente, en microdispositivos. Además, se ha evidenciado que pueden romper flóculos suspendidos en tratamientos de floculación de aguas residuales debido a la turbulencia generada (Fleite et al., 2020).

Considerando que los mezcladores estáticos de CE son buenos promotores de la turbulencia, y que además su operación implica menores costos energéticos que un dispositivo de cavitación, en esta tesis se decidió analizar la influencia de interponer un mezclador estático de CE en el proceso de lavado en recirculación de los RLC delignificados. Al igual que para los lavados intensificados por HC, se analizó el efecto del empleo del mezclador de CE sobre el lavado de papel de filtro como referencia.

Capítulo 2 : Metodología

El principal objetivo de este trabajo fue analizar estrategias de intensificación de la etapa de sacarificación enzimática de residuos lignocelulósicos, con el fin de maximizar la producción de azúcares fermentables. Este capítulo contiene la descripción de los materiales y los principales procedimientos utilizados en la tesis tanto para el tratamiento de las muestras como para su caracterización.

La **Figura 2.1** representa el diagrama de flujo del proceso empleado para la obtención de azúcares fermentables a partir de sustratos lignocelulósicos. En primer lugar, los sustratos fueron tratados mecánicamente para obtener una granulometría uniforme. Luego, pasaron a una etapa de hidrólisis ácida oxidativa que tiene por objetivo reducir el contenido de lignina en el sólido sin descomponer en gran medida el contenido de celulosa. Posteriormente, se incluyó una etapa de lavado del sólido para eliminar los reactivos empleados en la hidrólisis ácida-oxidativa. Es en esta etapa en la que se incorporaron estrategias de intensificación. Finalmente, el sólido resultante se sacarificó mediante una hidrólisis enzimática. A continuación, se detallarán cuáles fueron los sustratos estudiados y se describirán los detalles de cada una de las etapas esquematizadas en la **Figura 2.1**.

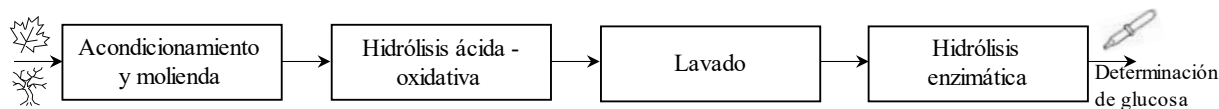


Figura 2.1. Diagrama de flujo del proceso de obtención de glucosa a partir de sustratos lignocelulósicos.

2.1 Sustratos empleados

2.1.1 Sustratos modelo utilizados como referencia

Con el fin de analizar el efecto de las distintas estrategias sobre un sustrato compuesto únicamente por celulosa, se empleó papel de filtro *Munktell* grado 3W de 80g/m² como sustrato modelo. Todos los ensayos realizados sobre los distintos sustratos lignocelulósicos fueron contrastados con los resultados obtenidos con este papel de filtro. También se empleó

carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato base para algunos experimentos. La CMC tiene por principal característica el reemplazo de algunos grupos oxhidrilo por carboximetilos, teniendo una estructura menos lineal que la celulosa, y siendo mucho más soluble en agua. En la **Figura 2.2** se pueden observar las estructuras de estos dos sustratos modelo.

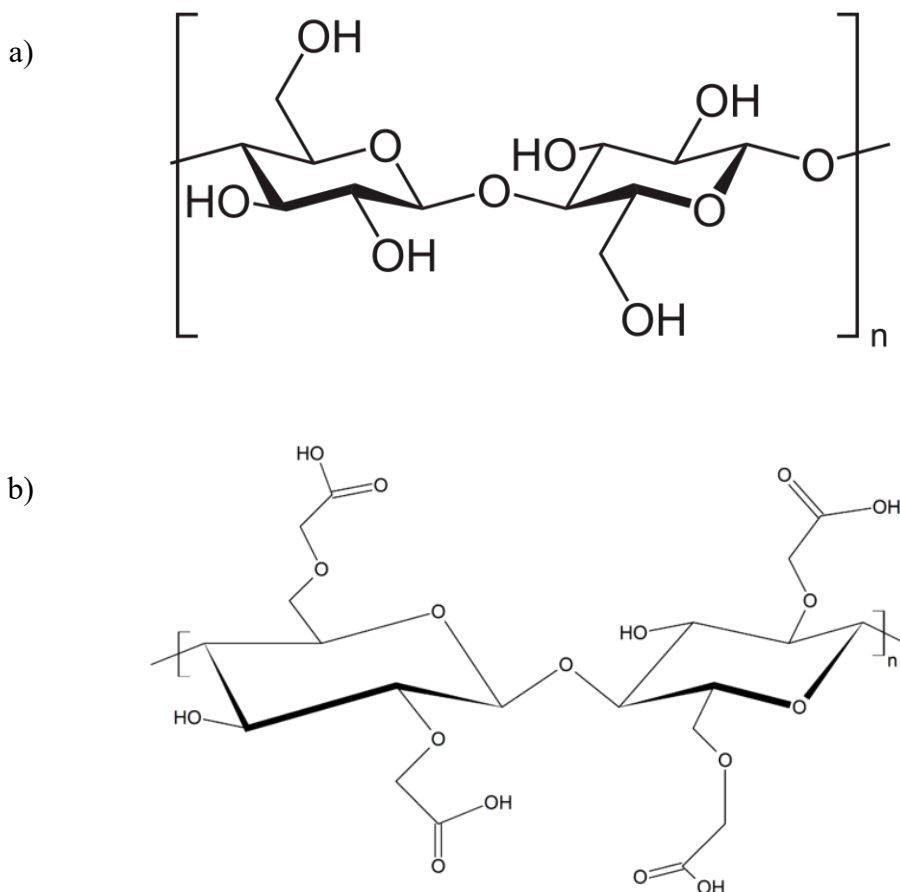


Figura 2.2. Estructuras de los sustratos considerados modelo: a) Celulosa; b) Carboximetilcelulosa.

2.1.2 Residuos lignocelulósicos (RLC)

Dado que el objetivo del trabajo es la valorización de residuos lignocelulósicos, como sustratos lignocelulósicos se han empleado residuos de madera de distintas especies, Eucalipto (*Eucalyptus sp.*), Tipa (*Tipuana tipu*) y Pino (*Pinus sp.*), y hojas secas de Plátano (*Platanus acerifolia*). La

madera de Eucalipto se obtuvo de cajones de frutas, la de Pino de residuos de mobiliario, y la de Tipa y las hojas de Plátano de residuos de poda.

2.2 Caracterización de los sustratos

2.2.1 Determinación de humedad

Todos los ensayos realizados tienen en consideración la relación sólido/líquido, tomando al sólido en base seca, a fin de asegurar que la relación sea siempre la misma, independientemente del sustrato utilizado. Para ello es necesario determinar la humedad de los sustratos crudos, antes de las etapas de lavado y sacarificación enzimática. La humedad se midió en una termobalanza Sartorius MA35 operando a una temperatura constante de 105°C.

2.2.2 Morfología y Composición

Los sustratos empleados fueron observados mediante microscopía de barrido electrónico (SEM) para analizar su morfología. Las microscopías SEM fueron realizadas en el Centro de Microscopías Avanzadas (FCEyN, UBA) con un microscopio de barrido electrónico Zeiss GeminiSEM 560 de ultra alta resolución a 3kV.

Por otra parte, también fueron observados mediante microscopía óptica de tinción con el objetivo de ver no sólo su morfología, sino también la presencia de lignina. Se empleó el método de preparación de muestras indicado en el AATC (manual americano de tinción textil) para la identificación de fibras mediante microscopía. Para ello, se pone en contacto a la muestra húmeda con una mezcla 1:1 de una solución de floroglucinol al 2% m/m con HCl concentrado. El coniferaldehído, componente específico de la lignina, reacciona con el floroglucinol en medio ácido formando un compuesto coloreado característico de color rosado o púrpura; se conoce como reacción de Wiesner (Davidson et al. 1995; Lin & Dence, 1992; Tapia-Torres et al., 2014). La microscopía se llevó a cabo en un microscopio Olympus CX31 (CQIyA-FAUBA) con una cámara acoplada AmScope, permitiendo el registro de imágenes.

Dado que se busca analizar la eficiencia de los pretratamientos, se estimó el contenido de lignina y de celulosa de los sustratos sometidos a los distintos tratamientos estudiados, en referencia a la composición de los sustratos crudos (sin tratar). La composición de los mismos se estimó a partir de un análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) (Kostyukov et al.,

2023; Wittner et al., 2023; Zhou et al., 2015). Estos espectros fueron medidos en el Instituto de Química, Física de Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE – UBA, CONICET) en un espectrofotómetro FTIR Vertex 70 en el rango de 4000 a 650 cm^{-1} a una resolución de 4 cm^{-1} .

2.2.3 Cristalinidad

La cristalinidad de las muestras fue evaluada mediante difracción de rayos X (DRX). Estas mediciones se realizaron en el Instituto de Química Física de Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE – UBA, CONICET) en un difractómetro Panalytical Empyrean, usando $\text{Cu K}\alpha 1 = 1.54$ y un detector PIXcel^{3D}. El índice de cristalinidad (%) fue estimado mediante la ecuación (2.1) según lo propuesto en literatura (Segal et al., 1959; Yupanqui-Mendoza et al., 2023).

$$\text{Cristalinidad}(\%) = \frac{I_{CR} - I_{AM}}{I_{CR}} \cdot 100 \quad (2.1)$$

donde I_{CR} e I_{AM} son la intensidad de los picos de las regiones cristalina y amorfa, respectivamente. I_{CR} corresponde al máximo de intensidad correspondiente a 22,5°, mientras que I_{AM} corresponde al mínimo de intensidad ubicado a 18°. Si bien este método de estimación de la cristalinidad suele dar resultados sobreestimados, con errores que pueden alcanzar hasta un 20%, es simple y especialmente útil para comparar la cristalinidad de sustratos que fueron sometidos a distintos métodos de pretratamiento (Salem et al., 2023).

Todas las técnicas descriptas en esta sección fueron empleadas para caracterizar los sustratos sin pretratamiento y, en el caso de los pretratados, luego de la etapa de lavado.

2.3 Acondicionamiento y molienda de los sustratos

Todos los sustratos debieron pasar por una etapa inicial de reducción de tamaño. Según el tipo de sustrato, metodología de recolección y estado inicial, se plantearon diferentes operaciones de acondicionamiento. El caso más sencillo fue el del papel de filtro, que fue cortado en cuadrados de 5 x 5 mm a partir de hojas de 22 x 22 cm utilizando una máquina trituradora de papel. La madera de Eucalipto proviene de residuos de cajones de frutas, por lo que debió ser primero triturada con una chipeadora (**Figura 2.3a**) y luego en un molino de hélice (**Figura 2.3b**). La madera de Tipa se encontraba disponible como viruta porque provino de la poda de un árbol del parque de Ciudad Universitaria; la viruta fue directamente triturada en el molino. La madera de Pino se disponía

como un listón por ser un residuo mobiliario; en consecuencia, fue en primer lugar cortada en láminas y luego triturada en el molino. Finalmente, todas las maderas molidas fueron tamizadas en un equipo vibrador Zonytest, que trabaja a 2500 golpes por minuto y cuenta con tamices de distinto mallado, obteniéndose dos distribuciones de tamaños de partículas, de diámetros entre 590 y 1350 μ m, y de diámetros entre 297 y 590 μ m. Las partículas grandes que quedaron por fuera de esos rangos fueron nuevamente molidas y tamizadas.

Las hojas de plátano fueron trituradas en la chipeadora y luego humedecidas para poder ser trituradas en una licuadora de 2200W a 35000rpm.



(a)



(b)



Figura 2.3. Equipos de reducción de tamaño. (a) Chipeadora (Potencia: 2500W). (b) Molino de hélice (Potencia: 850W; velocidad: 2800rpm; distribución de tamaños: 30-300mesh).

Todas las muestras (a excepción del papel de filtro) fueron almacenadas en freezer para evitar la proliferación de microorganismos.

2.4 Delignificación

La lignina es un polímero fenólico que recubre y une las fibras de celulosa y hemicelulosa de los sustratos lignocelulósicos. Dado que la misma no es sensible a la actividad de las celulasas que serán empleadas en la hidrólisis enzimática para obtener glucosa, debe ser removida. Además, como se discutió en el Cap. 1, la lignina puede presentar un efecto inhibitorio sobre las celulasas.

Una vez que los sustratos fueron molidos y tamizados, debieron ser sometidos a una primera etapa de tratamiento para reducir su contenido de lignina al mínimo posible. Esto se llevó a cabo mediante una hidrólisis ácido-oxidativa con una mezcla equívolumétrica de H_2O_2 100 volúmenes y ácido acético glacial (HPAC), dado los buenos resultados que presenta esta técnica tanto en el porcentaje de lignina removida, como en el rendimiento de sólidos. Asimismo, como se lleva a cabo en condiciones moderadas, permite obtener un producto final con una muy baja concentración de sustancias inhibidoras de celulasas, las que podrían perjudicar la etapa siguiente de hidrólisis enzimática (Mota et al., 2019; Wi et al., 2015; Ying et al., 2023). Bajo determinadas condiciones de temperatura, y favorecida por la agitación orbital, esta reacción permite depolimerizar parcialmente y solubilizar la lignina, dando como resultado un sólido mayormente delignificado, enriquecido en celulosa y hemicelulosa. Las condiciones para llevar a cabo esta etapa se decidieron a partir de un estudio previo sobre hojas de Plátano (Kildegaard et al., 2022). De esta manera, las digestiones se realizaron en Erlenmeyers llenados a un quinto de su volumen, con una relación sólido/líquido de 60g/L, en un baño termostatzado a 90°C y con agitación orbital a 100 rpm, durante 1 h (**Figura 2.4**).



Figura 2.4. Baño termostatzado con agitación orbital donde se realizaron las hidrólisis ácido-oxidativas.

2.5 Proceso de lavado de los residuos pretratados con HPAC

Las muestras delignificadas deben ser sometidas a una etapa de lavado a fin de eliminar el remanente de ácido acético y peróxido de hidrógeno que queda en ellas. Esto es necesario dado que concentraciones apreciables de H_2O_2 pueden inhibir la actividad de las celulasas que actúan luego en la hidrólisis enzimática. Asimismo, tampoco son deseables altas concentraciones de ácido acético debido a que las celulasas trabajan en un rango de pH de 4,75-5,0.

La etapa de lavado generalmente no se considera relevante; sin embargo, ofrece la oportunidad de incorporar en ella métodos de intensificación de procesos que permitan lograr una mayor eficiencia en la etapa posterior de hidrólisis enzimática. Estos métodos están orientados a eliminar compuestos tóxicos provenientes de la depolimerización de la lignina y de la descomposición térmica de los azúcares, que puede generar furfurales. Asimismo, en el proceso de lavado, se puede intensificar la hidrólisis enzimática posterior, promoviendo la disgregación y separación de las fibras de celulosa. A fin de analizar los efectos de los métodos de intensificación del proceso de lavado sobre la posterior hidrólisis enzimática, se estudiaron distintos procedimientos para llevar a cabo el lavado de los sólidos delignificados, que se detallan en las secciones siguientes.

Finalmente, se sometió al papel de filtro (sustrato modelo) a estos procesos de lavado para evaluar los efectos que éstos pudieran tener sobre el sólido, más allá de eliminar el remanente de la solución acético- H_2O_2 utilizada durante la hidrólisis ácida-oxidativa.

2.5.1 Lavado por inmersión

Es el procedimiento de lavado más sencillo de todos los estudiados y es el más aproximado al método convencional que se utiliza típicamente en procesos industriales, dado que el uso de agua en cantidades importantes está restringido por su costo. A fin de no perder masa en el proceso, el sólido se coloca en un envoltorio de tela filtrante y se lo sumerge en 5L de agua destilada donde se lo mantiene sumergido durante una hora. El agua se agita durante ese período con una bomba de pecera para asegurar la circulación y promover la turbulencia alrededor del contenedor del sólido (**Figura 2.5**). La temperatura se mantiene a $35 \pm 5^\circ\text{C}$.

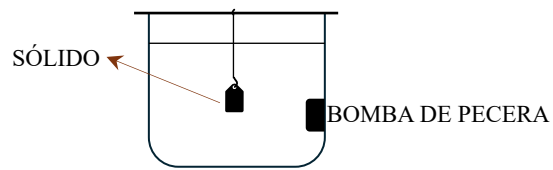


Figura 2.5. Esquema del sistema empleado para el lavado por inmersión.

2.5.2 Lavado con recirculación de agua

En este caso el sólido se mantiene contenido en una expansión cónica, soportado sobre una tela filtrante que lo retiene, evitando así su circulación a través del sistema (**Figura 2.6**). Se coloca el sólido en el recipiente, y desde un reservorio de 5 L, se hace circular agua destilada impulsada por una bomba centrífuga a un caudal de 5,6 L/min durante 1 h. La **Figura 2.7** representa esquemáticamente el *setup* de este procedimiento de lavado. La temperatura se mantiene a $35 \pm 5^\circ\text{C}$.

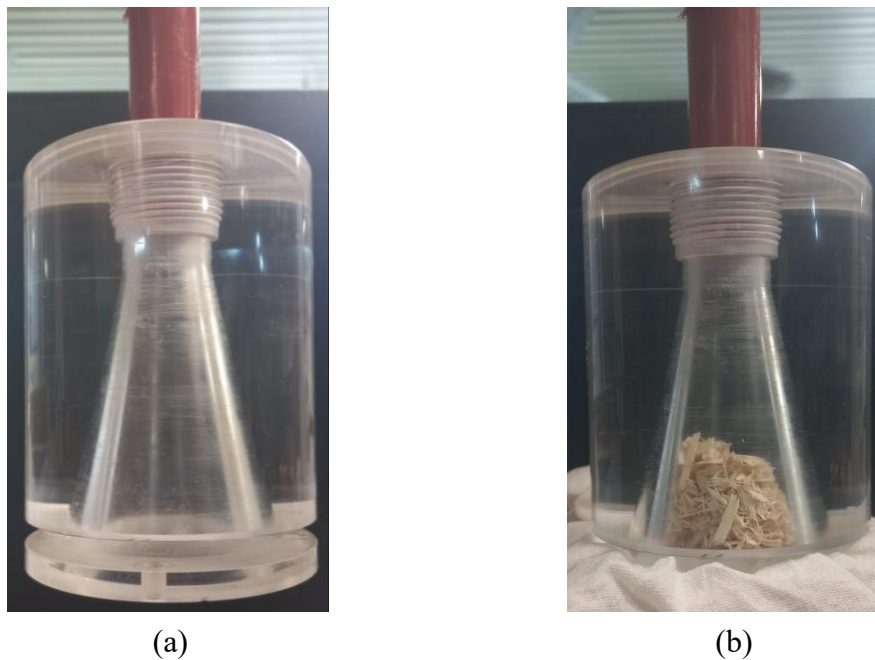


Figura 2.6. Cono empleado para soportar el sólido. (a) Vacío. (b) Con el sustrato retenido por la tela filtrante.

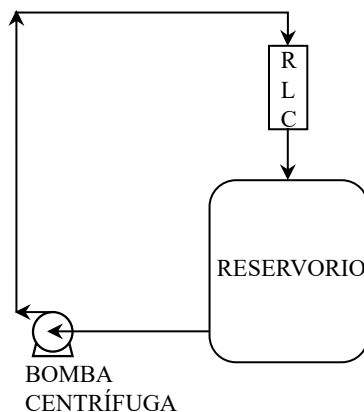


Figura 2.7. Esquema del setup empleado para el procedimiento de lavado con recirculación de agua sin circulación de sólido.

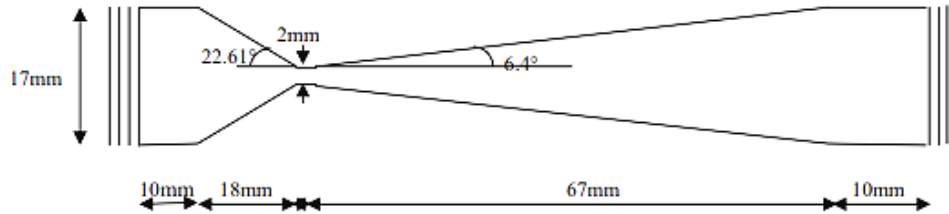
2.5.3 Lavado con recirculación intensificado por cavitación hidrodinámica

El uso de la cavitación hidrodinámica como método de intensificación de procesos de oxidación avanzada ha sido sugerido en los últimos años y se emplea cada vez con mayor frecuencia. La cavitación ocasiona ondas de choque expansivas que tienen efectos mecánicos de disgregación sobre los sólidos con los que interactúan. Además, promueve la generación de radicales libres fuertemente oxidantes, que ayudan a la disgregación del material y a eliminar posibles zonas ocluidas. Por todo ello, en este trabajo se propuso emplear la cavitación hidrodinámica durante la etapa de lavado del sólido que se someterá posteriormente a hidrólisis enzimática.

2.5.3.1 Sin circulación del sólido

En este caso, el sistema es similar al de la sección 2.5.2 con la diferencia que, previo a circular sobre el sólido, el agua pasa a través de un cavitador de tipo Venturi. El tubo Venturi fue construido en acrílico siguiendo las características del diseño presentado por Saharan et al. (2011). Las dimensiones son tales que permiten maximizar la velocidad de flujo en la garganta, evitar pérdidas de energía debidas a turbulencias o resistencias al flujo, y optimizar el número de cavitación (C_v). La **Figura 2.8** presenta las dimensiones del Venturi utilizado y una foto de agua circulando a través del mismo, donde puede observarse la nube de cavitación. Para este sistema, se trabajó con una caída de presión de 4 bar a través del Venturi. Debido a la fricción en la bomba centrífuga, se genera un aumento indeseado de temperatura que afecta directamente la pérdida de carga y, por lo tanto, al C_v . Por esta razón, es fundamental controlar la temperatura del sistema.

Durante el lavado, se termostató el sistema colocando una serpentina de acero inoxidable en el tanque reservorio a través de la cual se hizo circular agua de red, permitiendo mantener la temperatura alrededor de los $35 \pm 5^\circ\text{C}$. La **Figura 2.9** presenta un esquema del *setup* empleado para este método de lavado. Se realizaron ensayos manteniendo la circulación de agua por distintos períodos de tiempo, lo que equivale a diferentes números de pasos a través del dispositivo de cavitación.



(a)



(b)

Figura 2.8. Esquema y foto del dispositivo de cavitación tipo Venturi utilizado, diseñado siguiendo la propuesta de Saharan et al. (2011). (a) Croquis y dimensiones (b) Foto del agua circulando a través del Venturi.

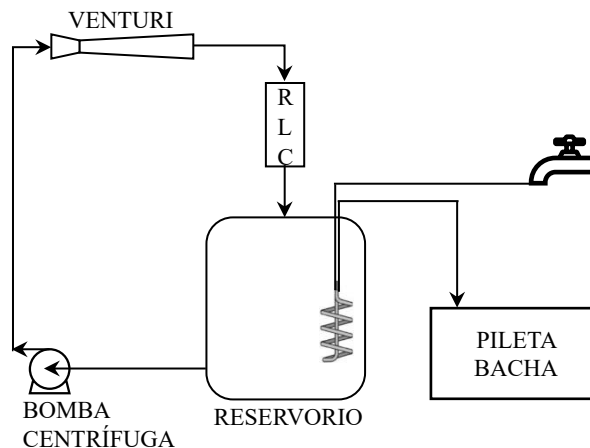


Figura 2.9. Esquema del setup empleado para el procedimiento de lavado con recirculación intensificado por cavitación hidrodinámica, sin circulación de sólido.

2.5.3.2 Con circulación del sólido

En este caso, se hace circular el sólido a través del dispositivo de cavitación para lo cual se dispone de una bomba tornillo, apta para impulsar suspensiones. Una suspensión con una carga de sólidos de 1g/L se impulsa desde un reservorio de 5 L. El *setup* de este método de lavado se encuentra esquematizado en la **Figura 2.10**.

Para asegurar el adecuado funcionamiento de la bomba y evitar también posibles taponamientos del tubo Venturi, se emplean sólidos con un tamaño de partícula entre 297 y 590 μ m (polvo).

Al emplear el mismo tipo de cavitador que el método de lavado descrito en la sección 2.5.3.1., también es necesario lograr que la caída de presión a través del Venturi sea de 4 bar. Para ello, se debe ajustar el caudal que circula mediante el variador de frecuencia acoplado a la bomba. Dado que para la frecuencia nominal no se alcanza el ΔP necesario, se debe ajustar la temperatura del sistema para lograrlo. En este caso, a diferencia del anterior donde la fricción en la bomba centrífuga es considerable, no se observan aumentos de temperatura en el agua como consecuencia de la circulación a través del sistema. Por eso es necesario calentar inicialmente el agua a $35 \pm 5^\circ\text{C}$, lo que permite que la caída de presión en el Venturi sea la deseada. Durante el tiempo que requiere el ensayo, la pérdida de calor al ambiente es despreciable por lo que no se requiere un control de la temperatura *in situ*.

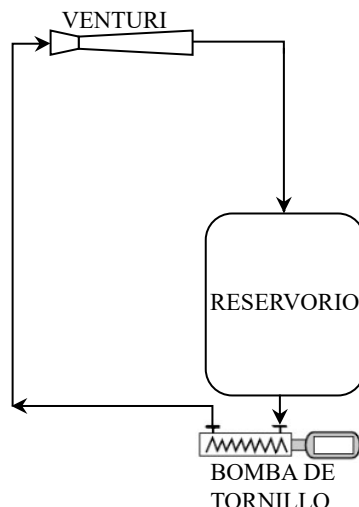


Figura 2.10. Esquema del setup empleado para el procedimiento de lavado con recirculación intensificado por cavitación hidrodinámica, con circulación de sólido.

2.5.4 Lavado con recirculación intensificado con mezclador estático de contracción-expansión (CE)

En este tipo de lavado se hace circular el sólido a través de un mezclador estático de contracción-expansión (CE), el cual fue diseñado en el marco de esta tesis. Se construyó un dispositivo en acrílico de 40 cm de largo, con un arreglo de 7 contracciones-expansiones. El diámetro de contracción es de 2,3 cm, y el diámetro expandido es de 4,1 cm; la longitud de contracción de 1,1 cm, y la longitud expandida de 4,5 cm. Una descripción más detallada del mismo y de los criterios adoptados para su diseño se dará en el Capítulo 5. El esquema del *setup* se presenta en la **Figura 2.11**. En este caso se parte de un reservorio de 6 L de agua destilada y se alimenta el sólido de manera de tener una relación sólido/líquido de 1 g/L. Este método de lavado se aplicó sobre el papel de filtro y sobre la madera de Eucalipto con una distribución de tamaños 590 y 1350 μm . El sistema cuenta con una bomba centrífuga de impulsor abierto que permite la circulación de sólidos. El caudal de circulación se ajustó mediante un variador de frecuencia acoplado a la bomba, de forma tal de tener un $Re \approx 10000$. A fin de que sea comparable con los ensayos intensificados con cavitación hidrodinámica, se decidió mantener la temperatura en $35 \pm 5^\circ\text{C}$ mediante la circulación de agua caliente proveniente de un termostatzador a través de un serpentín de acero inoxidable colocado en el tanque reservorio.

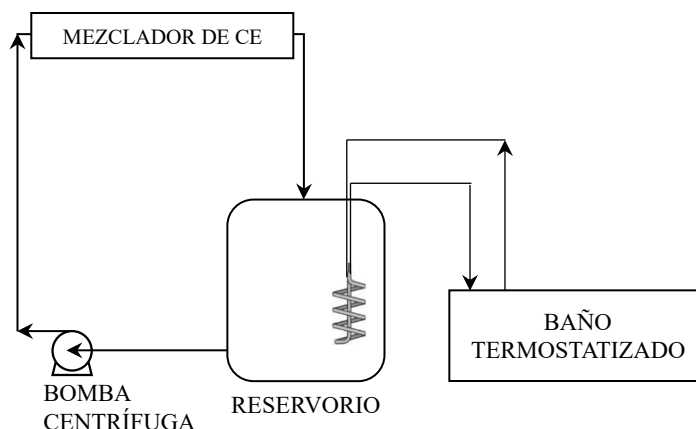


Figura 2.11. Esquema del setup empleado para el procedimiento de lavado con recirculación intensificado por promoción de turbulencia mediante un mezclador estático de CE.

A fin de poder cuantificar el efecto que pudiera tener la bomba centrífuga sobre el sólido al circular a través de ella, se contrastaron los resultados obtenidos sobre los sustratos lavados bajo las mismas condiciones en el mismo *setup* en el cual se reemplazó el dispositivo de CE por un tramo recto de igual diámetro, pero sin contracciones (**Figura 2.12**)

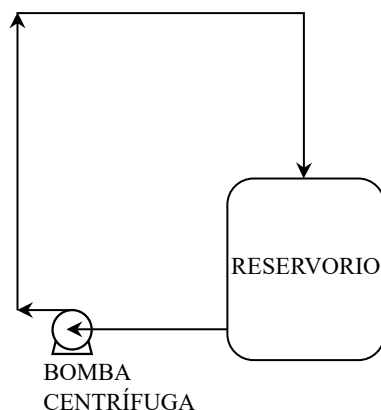


Figura 2.12. Esquema del setup empleado para el procedimiento de lavado con recirculación a través de un caño sin contracciones.

2.6 Sacarificación enzimática

Luego del pretratamiento mecánico y químico, y de la etapa de lavado, se realizó una hidrólisis enzimática (sacarificación) de las muestras sólidas. Para ello se utilizaron distintos cocteles comerciales de celulasas, con el fin de obtener glucosa a partir de la celulosa. Las sacarificaciones

se llevaron a cabo en las condiciones de temperatura y pH óptimas informadas por el proveedor de cada enzima comercial.

Los ensayos de sacarificación se realizaron mayormente en batch, aunque también se evaluó realizarlos con recirculación empleando los distintos métodos de intensificación propuestos, para evaluar su efecto al aplicarlos durante la hidrólisis enzimática.

La evolución de la sacarificación se siguió mediante la determinación de la concentración de glucosa generada, dado que es el principal sustrato base de carbono utilizado en numerosos procesos biotecnológicos. Esta medida permite determinar los efectos que han tenido las etapas previas, además de las condiciones en las que es conveniente llevar a cabo la sacarificación propiamente dicha.

2.6.1 Celulasas empleadas

Para la hidrólisis enzimática se emplearon cócteles comerciales de celulasas, que fueron donados por distintas empresas.

En primer lugar, se empleó el coctel Surenzyma® AC-100 provisto por la empresa nacional Surfactan (<https://www.surfactan.com.ar/es/home-spanish/textil/lavaderos/enzimas/surenzima-ac-1000>), comercializado como celulasa ácida para tratamiento de telas. Esta empresa importa esta mezcla de celulasas para destinarlas a la industria textil que la emplea, entre otros fines, para generar el efecto desgastado en la tela de jean. La empresa realizó una primera donación en 2019 que se empleó en los primeros ensayos de esta tesis, obteniéndose buenos resultados. En consecuencia, se solicitó una segunda donación en 2022, pero con esta nueva partida no fue posible obtener buenos rendimientos de glucosa por lo que fue necesario buscar otra mezcla comercial de celulasas para poder continuar con el plan de trabajo previsto.

Dado que en Argentina no se comercializa un coctel con función específica de sacarificación de celulosa, se decidió buscar en el extranjero. Afortunadamente, se obtuvo una donación de la empresa Novozymes (de su sede en Brasil) del cóctel comercial Cellic CTec3® HS (<https://www.novozymes.com/en/products/ethanol/cellic-ctec3-hs>), tratándose de celulasas de *Trichoderma reesei*. Una vez que se probó dicho coctel, al obtenerse aún mejores resultados que los obtenidos con el cóctel de Surenzyma® original, se continuaron todos los ensayos con esta nueva mezcla.

Para ambas mezclas comerciales de enzimas se procedió a hacer la determinación de concentración de proteína con el método de Bradford (He, 2011), y su actividad dada en unidades de FPU/mL, siguiendo el método informado por Adney y Baker (1996). La unidad de papel de filtro (Filter Paper Units -FPU- por sus siglas en inglés) es una medida de la actividad enzimática, definida por la IUPAC como la cantidad de enzima necesaria para producir 2 mg de azúcares reductores a partir de 50 mg de papel de filtro en 1 h. En la **Tabla 2.1** se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 2.1. Concentración de proteína y actividad de los cócteles comerciales de celulasas empleadas.

Enzima comercial	Concentración de proteína (mg/mL)	Actividad (FPU/mL)
Surenzyme® AC-100	9	5
Cellic CTec3® HS	127	175

2.6.2 Ensayos del proceso en batch

Para los ensayos en batch, el sólido fue colocado en Erlenmeyers de 100ml, junto con 50ml de agua o buffer acético/acetato. Luego, una vez ajustado el pH al óptimo indicado por el proveedor de la enzima, se dosificó la misma y se colocaron los Erlenmeyers tapados con film en un baño termostatzado a la temperatura óptima de trabajo de la enzima (al igual que como se realizaron las hidrólisis ácido-oxidativas durante la delignificación). Este baño cuenta con agitación orbital. La mayoría de los ensayos fueron agitados a 100rpm. Durante las primeras 6 h de hidrólisis se tomaba muestra del líquido cada hora para realizar la determinación de glucosa, y luego se dejaba el sistema reaccionando durante un total de 28 h, luego de las cuales se volvía a realizar una determinación de glucosa, para estimar el rendimiento considerado como final de esta etapa.

La relación sólido/líquido, el dosaje de enzima, la posibilidad de obviar el uso de buffer, la velocidad de agitación y la posibilidad de emplear aditivos en esta etapa, fueron todas variables estudiadas durante esta tesis con el fin de encontrar las condiciones óptimas para la hidrólisis enzimática. Los resultados de estos análisis y mayores detalles se presentan en el Capítulo 3. En función de los resultados obtenidos en los ensayos de optimización, se definieron los parámetros para las sucesivas sacarificaciones que se realizaron posteriormente a fin de evaluar los efectos de la intensificación durante la etapa de lavado.

2.6.3 Ensayos del proceso con promoción del mezclado por recirculación del sólido

Con el fin de evaluar si la promoción del mezclado del sólido durante la etapa de hidrólisis enzimática favorece el contacto de la enzima con el sustrato y ocasiona algún efecto sobre la cinética y el rendimiento del proceso, se diseñaron ensayos con movimiento del sólido por recirculación sin y con promotores de turbulencia. En particular, se estudiaron los mismos sistemas presentados en la sección 2.5 para la intensificación de la etapa de lavado con circulación de sólidos. Estos métodos fueron examinados como posibles intensificadores de la etapa de hidrólisis enzimática.

En todos los casos se mantuvieron las condiciones óptimas de trabajo para la enzima, para lo cual fue necesario ajustar el pH inicial y mantener la temperatura alrededor de los 50-53°C. Para regular la temperatura, se empleó un serpentín sumergido en el reservorio por el cual circula agua caliente proveniente de un termostatzador (**Figura 2.13**). El procedimiento involucraba llenar el reservorio con 6 L de agua destilada, agregar 12 g de sólido (previamente delignificados y lavados) y ajustar el pH con ácido acético o hidróxido de sodio, según correspondía. Una vez que el sistema alcanzaba la temperatura necesaria, se agregaba la dosis de enzima correspondiente y se iniciaba el proceso. Luego, se tomaron muestras a distintos instantes de tiempo a fin de evaluar la generación de glucosa y los correspondientes rendimientos.

De esta manera, se estudiaron las sacarificaciones en los siguientes sistemas en recirculación:

- Circulación a través de un mezclador estático de contracción-expansión
- Circulación a través de un cavitador tipo Venturi

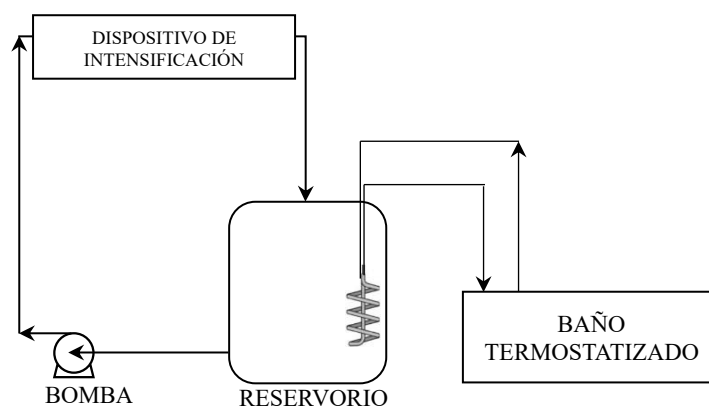


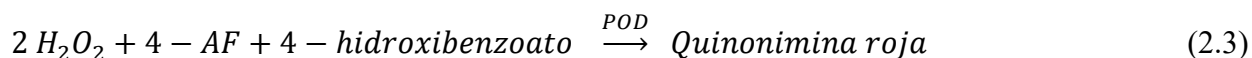
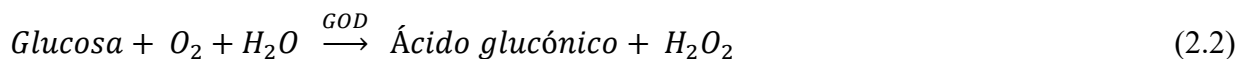
Figura 2.13. Esquema del setup empleado en los ensayos de sacarificación enzimática con promoción del mezclado por recirculación del sólido

2.7 Determinación de la glucosa generada durante la sacarificación

Como fuera mencionado en la sección 2.6, la eficiencia de la sacarificación se determinó a partir de la generación de glucosa, dado que es el principal sustrato base de carbono en muchos procesos biotecnológicos. El objetivo fue analizar el rendimiento de las sacarificaciones de los distintos sustratos sometidos a los distintos tratamientos, durante las hidrólisis enzimáticas. Para ello, se fueron tomando muestras del fluido del proceso a distintos tiempos para realizar la determinación de la concentración de glucosa y calcular la velocidad inicial de sacarificación y los rendimientos de glucosa obtenidos. La determinación de la concentración de glucosa se realizó empleando el test de glicemia de Wiener Lab® (<https://www.wiener-lab.com.ar/es-AR/search/glicemia>). Se trata de un kit enzimático que viene provisto de un reactivo A, que contiene glucosa oxidasa ($GOD \geq 10$ kU/L), peroxidasa ($POD \geq 1$ kU/L), 4-aminofenazona (4-AF= 0.5 mM), buffer fosfato (100 mM, pH= 7,0) y 4-hidroxibenzoato (12 mM).

Para realizar el test, se toma 1 μ L de la muestra a la cual se le desea determinar el contenido de glucosa y se le agregan 1000 μ L del reactivo A. Luego se lo deja incubar durante 10 minutos en un baño termostatzado a 37°C. Las ecuaciones (2.2) y (2.3) representan las reacciones que suceden durante la incubación. El siguiente link provee más detalles del kit: (<https://access.wiener->

lab.com/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/glicemia_enzimatica_aa_liquida_sp.pdf).



Este reactivo permite, en primer lugar, la oxidación de la glucosa presente en la muestra gracias a la presencia de la GOD. Luego, el H_2O_2 generado a partir de la primera reacción oxida a la 4AF catalizado por la presencia de POD obteniéndose quinonimina roja, un compuesto coloreado que permite realizar medición de la absorbancia. De esta manera, luego de la incubación, se mide la absorbancia de las muestras a 505 nm en un espectrofotómetro. La **Figura 2.14** esquematiza el procedimiento de determinación de glucosa.

El kit de glicemia incluye también una solución estándar de glucosa 1 g/L. A partir de ella se preparan diluciones que permiten armar una curva de calibración para así correlacionar la absorbancia medida con la concentración de glucosa.

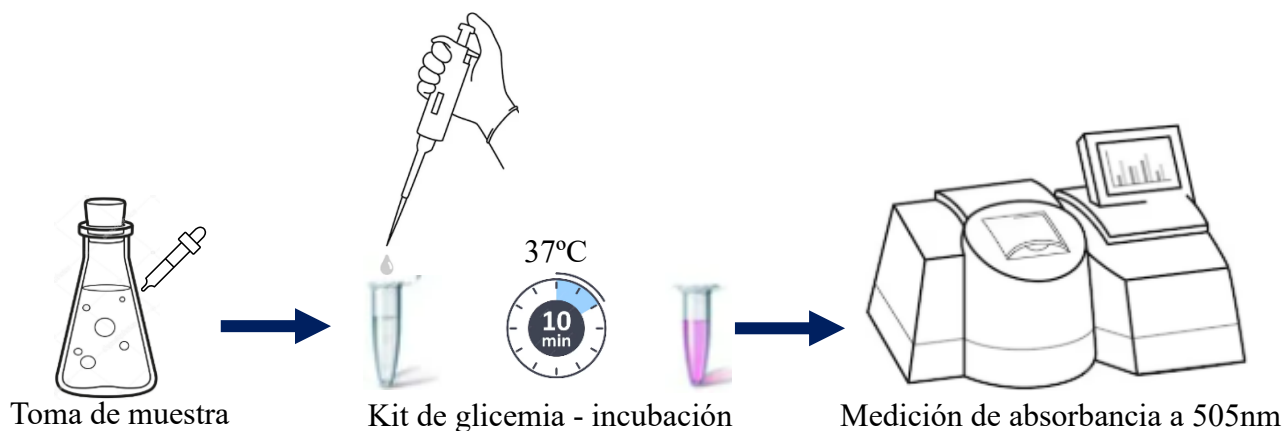


Figura 2.14. Esquema del procedimiento para determinación de glucosa.

Cabe aclarar que algunas de las muestras que se midieron durante este trabajo tienen cierto contenido de H_2O_2 remanente de la etapa de pretratamiento. Es por ello que es necesario siempre

hacer una determinación de la muestra a tiempo cero a fin de cuantificarla y evitar considerarla como parte de la glucosa obtenida.

Una vez determinada la concentración de glucosa, es posible calcular los rendimientos a distintos tiempos de la sacarificación a partir de la ecuación (2.4). Los mismos se calcularon como la glucosa generada referida a la masa inicial de celulosa. Cabe aclarar que, a los fines prácticos, se consideró a los distintos sustratos como si fuesen 100% celulosa, con lo cual los rendimientos se refieren directamente a la masa seca inicial del sólido a sacarificar.

$$Rendimiento (\%)_t = \frac{C_{glu,t} - C_{glu,0}}{C_{ss,0}} \quad (2.4)$$

Donde, $C_{glu,t}$ y $C_{glu,0}$ son las concentraciones de glucosa al tiempo “t” e inicial, respectivamente, en g/L, y $C_{ss,0}$ es la concentración inicial del sólido seco, también en g/L $\left(\frac{\text{masa inicial sólido seco}}{V \text{ líq}} \right)$.

A su vez, es posible determinar la velocidad inicial de reacción a partir de la curva de glucosa generada en función del tiempo. Para ello se calcula la pendiente de la recta tangente a la curva durante las primeras horas de reacción, obteniéndose la velocidad como los mg de glucosa generados por hora. El período de tiempo tomado dependerá de cada caso en particular, ya que la fase de crecimiento lineal de glucosa puede ser diferente. En la **Figura 2.15** se esquematiza el método de determinación de la velocidad inicial de reacción.

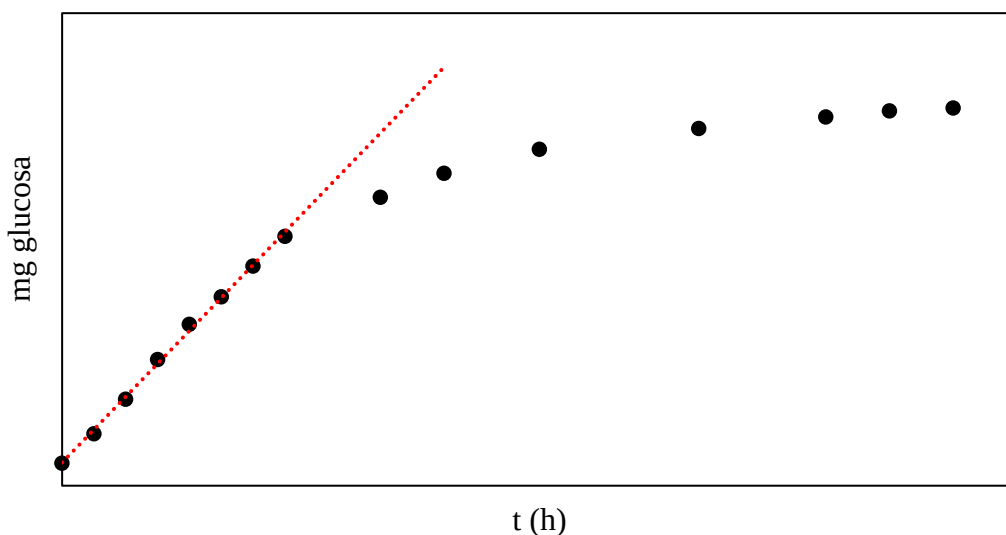


Figura 2.15. Representación de la determinación de la velocidad inicial de reacción a partir de la curva de glucosa generada en función del tiempo.

Capítulo 3 : Optimización del proceso de Sacarificación en batch

En este capítulo se detallan los ensayos que se realizaron orientados a encontrar las condiciones de hidrólisis enzimática más adecuadas, de forma tal de utilizar como referencia la condición óptima de sacarificación en batch para evaluar el efecto de los métodos de intensificación propuestos. Así, cualquier variación, positiva o negativa, será analizada en relación a la mejor condición empleada hasta el momento. Dado que, como se describió en el Capítulo 1, en la bibliografía hay muchos estudios que proponen el uso de surfactantes como método de promoción de la sacarificación, se analizó también la conveniencia de utilizar estos compuestos en forma sistemática. Cabe mencionar que, como se expuso en el Capítulo 2, se iniciaron los ensayos utilizando una formulación enzimática de comercialización local, de uso en la industria textil (Surenzima® AC-100), con el objetivo de emplear reactivos de fácil acceso en el país. De todos modos, ante la falta de reproducibilidad encontrada con esta formulación cuando hubo que reponerla, se recurrió a una formulación de Novozymes A/S, empresa dedicada a la producción de enzimas, y que es parte del Grupo Novonesis desde 2024. Generosamente, la empresa Novozymes (Holandesa, desde su filial en Brasil), nos donó una cantidad de su formulación Cellic CTec3® HS, específica para sacarificación de biomasa, con la cual se pudieron realizar el resto de los ensayos. Algunas condiciones fueron repetidas y para otros casos simplemente se avanzó sobre los resultados ya obtenidos. Solamente en este capítulo hay ensayos con la formulación Surenzima® AC-100. El resto de los capítulos de la tesis se realizaron íntegramente con la formulación Cellic CTec3® HS.

3.1 Optimización del dosaje de enzima

La actividad de ambos cocteles comerciales de celulasas empleados se observa en la **Figura 3.1**. Los dosajes informados corresponden al volumen del coctel comercial suministrado por cada 50ml de buffer acético/acetato. Este rango de dosajes fue seleccionado a fin de tener un rendimiento de glucosa significativo (de al menos un 30% del máximo) luego de 6 h de sacarificación. A partir de estos resultados se buscó determinar el dosaje de enzima a emplear en los posteriores ensayos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se decidió utilizar un dosaje de 150 μ l para el coctel de Surenzima® AC-100, siendo uno de los que generó mejores rendimientos de glucosa en el

rango evaluado, sin que un mayor dosaje haya presentado una mejora significativa (Fig. 3.1 a). Este dosaje corresponde aproximadamente a 8 FPU/g de sustrato. De igual forma, para el coctel de Novozymes Cellic CTec3® HS, se halló un dosaje óptimo de 25 μ l (Fig. 3.1 b), correspondiente a aproximadamente a 40 FPU/g de sustrato. Este dosaje permitió obtener resultados similares al dosaje elegido para el coctel de Surenzima® AC-100. Estos dosajes fueron empleados en los ensayos de sacarificación subsiguientes.

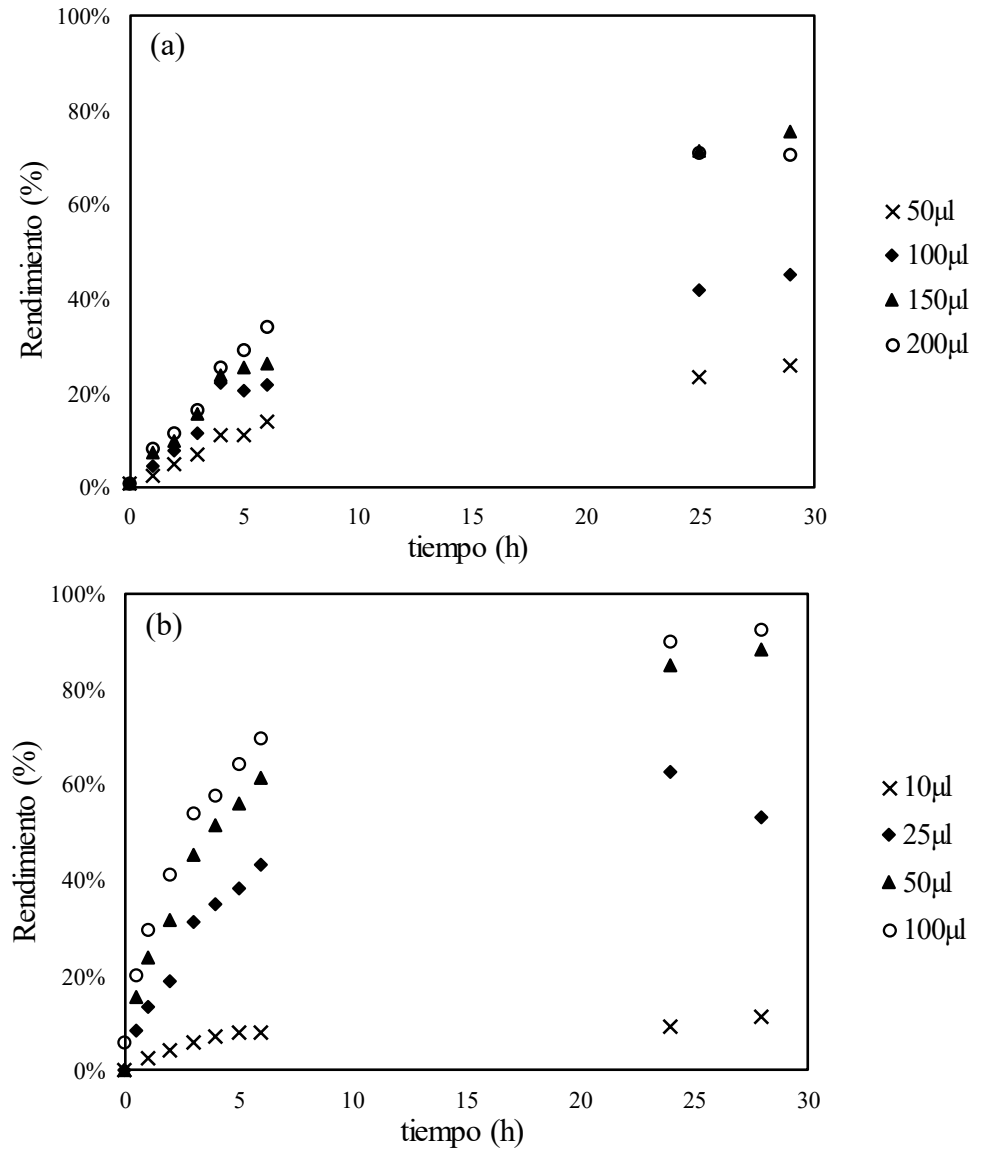


Figura 3.1. Sacarificación de papel de filtro. Condiciones experimentales: (a) Surenzima® AC-100: pH = 4.8, T = 323 K. (b) Novozymes Cellic CTec3® HS: pH = 5.0, T = 326 K

3.2 Efecto del uso de surfactantes no-iónicos como agente de intensificación de la actividad de la enzima

En numerosos trabajos se ha estudiado la posibilidad de emplear surfactantes como aditivos de intensificación durante la hidrólisis enzimática. En particular, como se detalla en el Capítulo 1, los que han dado mejores resultados han sido los surfactantes no iónicos. Sin embargo, se han presentado resultados un tanto contradictorios, y aún es poco clara la razón por la cual en algunas ocasiones mejoran el rendimiento de la sacarificación. Dentro de este panorama, se decidió estudiar el efecto del agregado de distintos surfactantes no iónicos, tanto en la hidrólisis de los sustratos modelo como de algunos de los residuos lignocelulósicos. El objetivo fue determinar si el agregado sistemático de estos aditivos era conveniente en todos los casos, como para establecerlo como condición óptima de referencia. La **Figura 3.2** muestra la estructura de los distintos surfactantes estudiados.

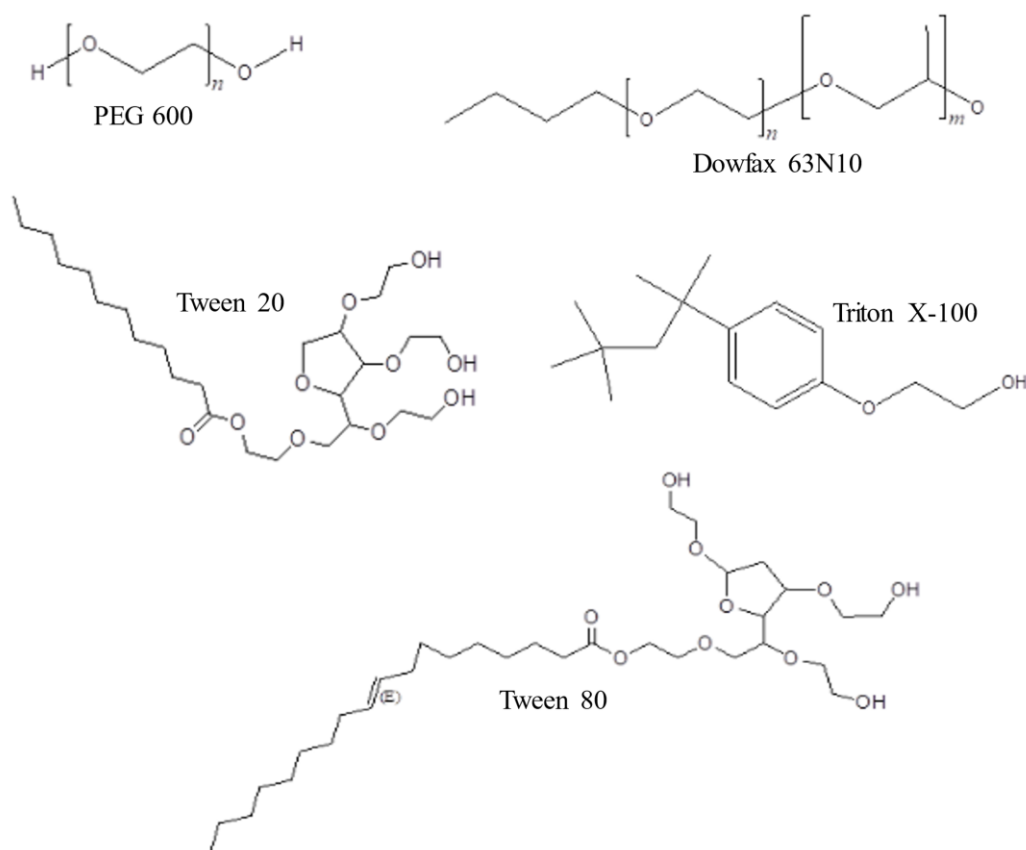


Figura 3.2. Estructura molecular de los surfactantes empleados.

En la **Figura 3.3** se resume la influencia del uso de surfactantes no iónicos sobre la velocidad inicial de sacarificación de papel de filtro, como así también sobre el rendimiento de glucosa luego de 6 y de 28 h de reacción, empleando ambos cocteles de celulasas (Surenzyme® AC-100 y Novozymes Cellic CTec3® HS). Si bien se introdujo una dosis alta de surfactante, de 4 g/L, se observó un efecto positivo en todos los casos, en contraposición con los resultados reportados en literatura, que sugieren que el empleo de surfactantes en algunos casos generó un efecto negativo sobre la sacarificación de papel de filtro (Chen et al, 2018; Zhou et al, 2015). La influencia fue más pronunciada durante las primeras horas de reacción, alcanzando aumentos en la velocidad inicial de generación de glucosa de 2,3 mg/h a 8,7 mg/h (278% de aumento) para el coctel de Surenzyme® AC-100, y de 5,1 mg/h a 10,8 mg/h (112% de aumento) para el coctel de Novozymes Cellic CTec3® HS gracias al agregado de PEG 600. Asimismo, el rendimiento tuvo un mayor incremento luego de 6 h que luego de 28 h de reacción. Al cabo de 6 h, para el coctel de Surenzyme® AC-100, el rendimiento pasó del 26 al 51%, y para el coctel de Novozymes Cellic CTec3® HS del 30 al 62%. Si bien el incremento fue menor, también se observó una mejora en el rendimiento luego de 28 h de reacción por el agregado de PEG 600, aumentando del 76 al 92% y del 49 al 95%, para Surenzyme® AC-100 y Novozymes Cellic CTec3® HS, respectivamente. Aunque el mayor efecto se obtuvo con PEG 600, el agregado de todos los surfactantes no iónicos testeados condujo a rendimientos mayores al 80% luego de 28 h de sacarificación. Los aumentos más significativos se observaron para el coctel de Novozymes Cellic CTec3® HS con el agregado de PEG 600 y de Dowfax 63N10. Esto puede estar relacionado con la estructura más lineal que tienen estos aditivos comparada con los demás surfactantes testeados. Es probable que este tipo estructura permita que las moléculas de aditivo les permitan intercalarse y facilitar la separación de las fibras lineales de celulosa del papel. En consecuencia, el efecto del empleo de estos aditivos parece estar relacionado con la afinidad entre las estructuras del surfactante y el sustrato.

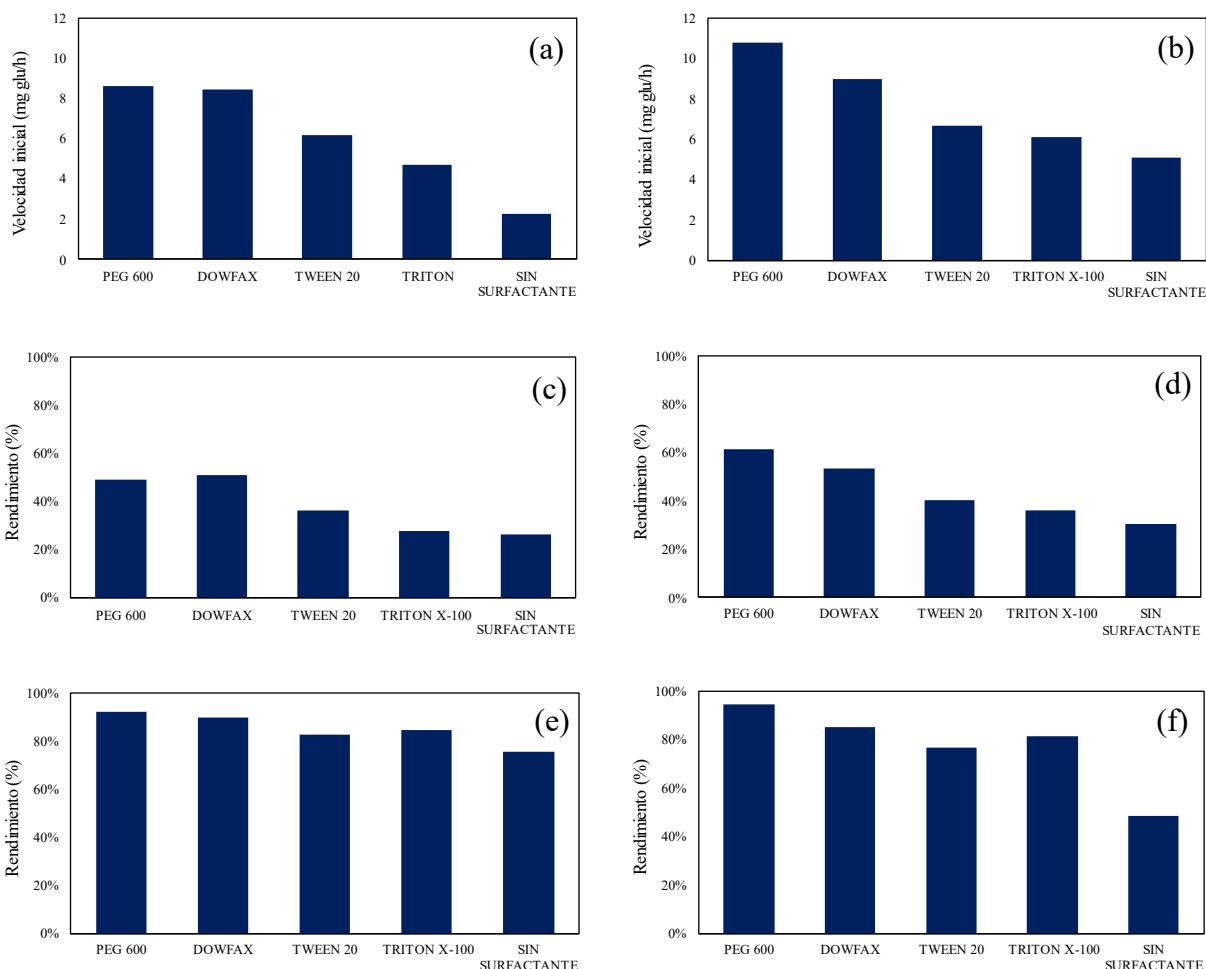


Figura 3.3. Comparación del efecto de los aditivos sobre la sacarificación de papel de filtro. Velocidad inicial con a) Surenzima® AC-100, b) Novozymes Cellic CTec3® HS; Rendimiento luego de 6 h con c) Surenzima® AC-100, d) Novozymes Cellic CTec3® HS; Rendimiento luego de 28 h con e) Surenzima® AC-100; f) Novozymes Cellic CTec3® HS.

En la **Figura 3.4** se muestra el efecto de la concentración de Dowfax 63N10 sobre la sacarificación de papel de filtro utilizando Novozymes Cellic CTec3® HS. Se observaron mejoras significativas en el rendimiento incluso con concentraciones muy bajas de surfactante, con incrementos en la velocidad inicial y en los rendimientos. Además, estos aumentos crecen junto con la concentración de surfactante. Estos efectos fueron mayores durante las primeras 6 h del proceso de sacarificación. A diferencia de los resultados encontrados en bibliografía, que reportaron algunos casos de influencia negativa al aumentar la concentración de surfactante (Chen et al, 2018; Zhou et al, 2015), el efecto positivo sobre la sacarificación del papel de filtro fue mayor

para concentraciones más altas de surfactantes dentro del rango analizado, que es similar a los utilizados en las referencias mencionadas.

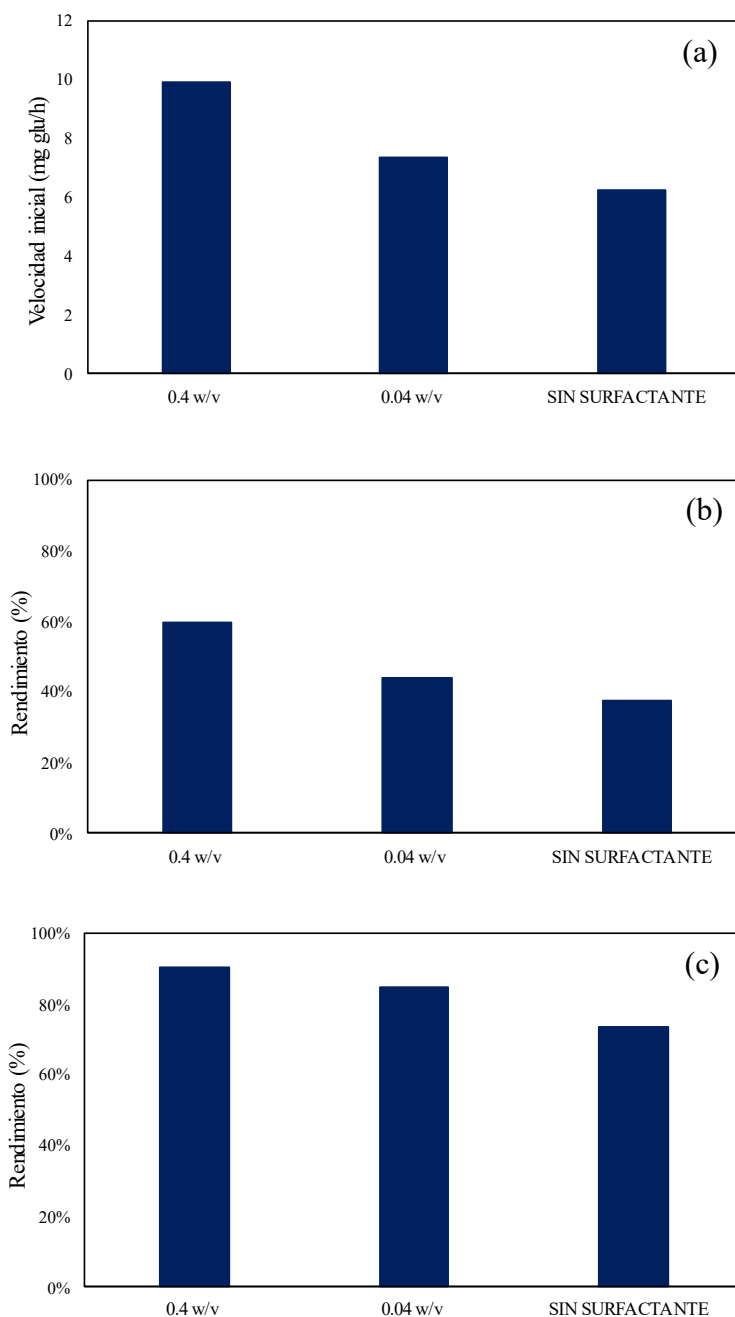
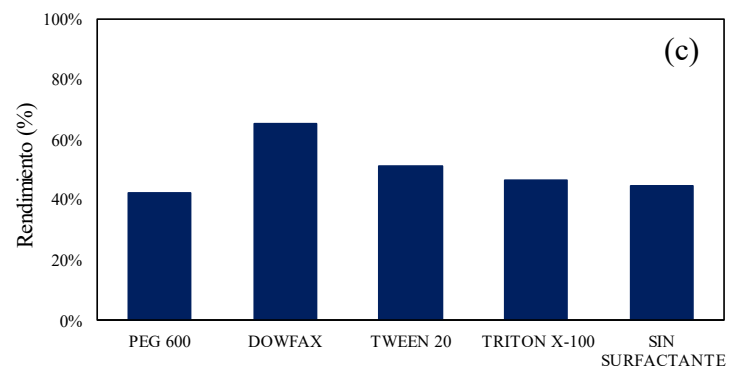
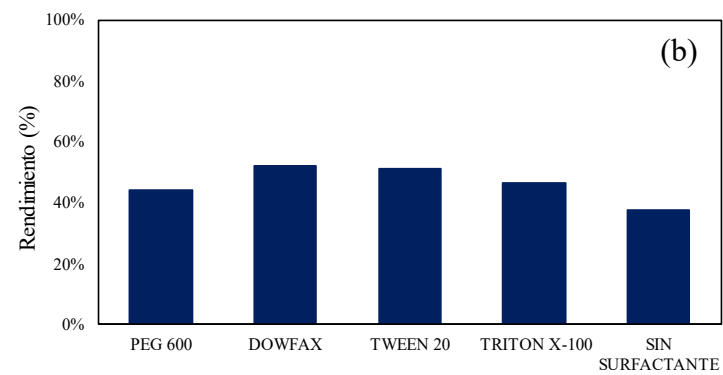
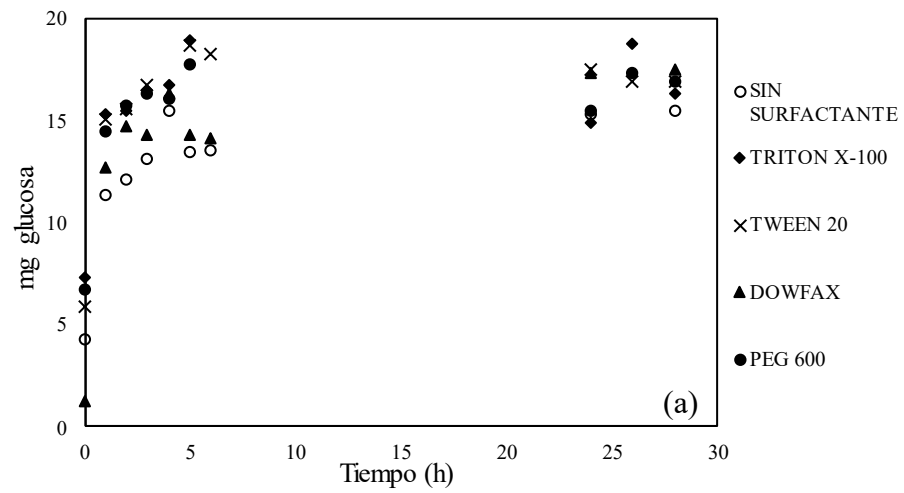


Figura 3.4. Efecto de la concentración de surfactante sobre la sacarificación de papel de filtro: (a) Velocidad inicial, (b) Rendimiento luego de 6 h, (c) Rendimiento luego de 28 h.

La influencia de los surfactantes no iónicos sobre la sacarificación de la carboximetilcelulosa (CMC) se muestra en la **Figura 3.5**. Se observa que durante las primeras 6 h de reacción el incremento en el rendimiento ronda entre el 19% y 39% para los distintos surfactantes estudiados, mientras que luego de 28 h el incremento es notorio sólo con el agregado de Dowfax 63N10, siendo del 45%. Teniendo en cuenta que con este último surfactante se obtuvo la mayor mejoría, se lo utilizó para comparar estos resultados con los obtenidos para la sacarificación de papel de filtro (**Figura 3.6**). Para la CMC, el efecto sobre el rendimiento de glucosa fue más notorio que para el papel de filtro a mayores tiempos de reacción, logrando un aumento del 45% (frente a un 19% para el papel de filtro) luego de 28 h. Sin embargo, para las primeras 6 h de reacción, el incremento en el rendimiento como consecuencia del agregado de surfactante es del 39% para la sacarificación de CMC, mientras que para el papel de filtro es del 94%. Los grupos carboxílicos presentes en la CMC podrían interactuar con los grupos amino de la enzima, inactivándola, como ocurre con la lignina (Liu et al., 2025). Los surfactantes no iónicos actuarían en este caso como una protección para la enzima, cubriendo los grupos carboxílicos y permitiendo que la misma acceda a las cadenas de celulosa, lo que explicaría el aumento de los rendimientos durante la sacarificación.

Figura 3.5. Comparación del efecto de los distintos surfactantes sobre la sacarificación enzimática de CMC: a) Evolución temporal de la masa de glucosa generada; (b) Rendimiento a las 6 h; (c) Rendimiento a las 28 h.



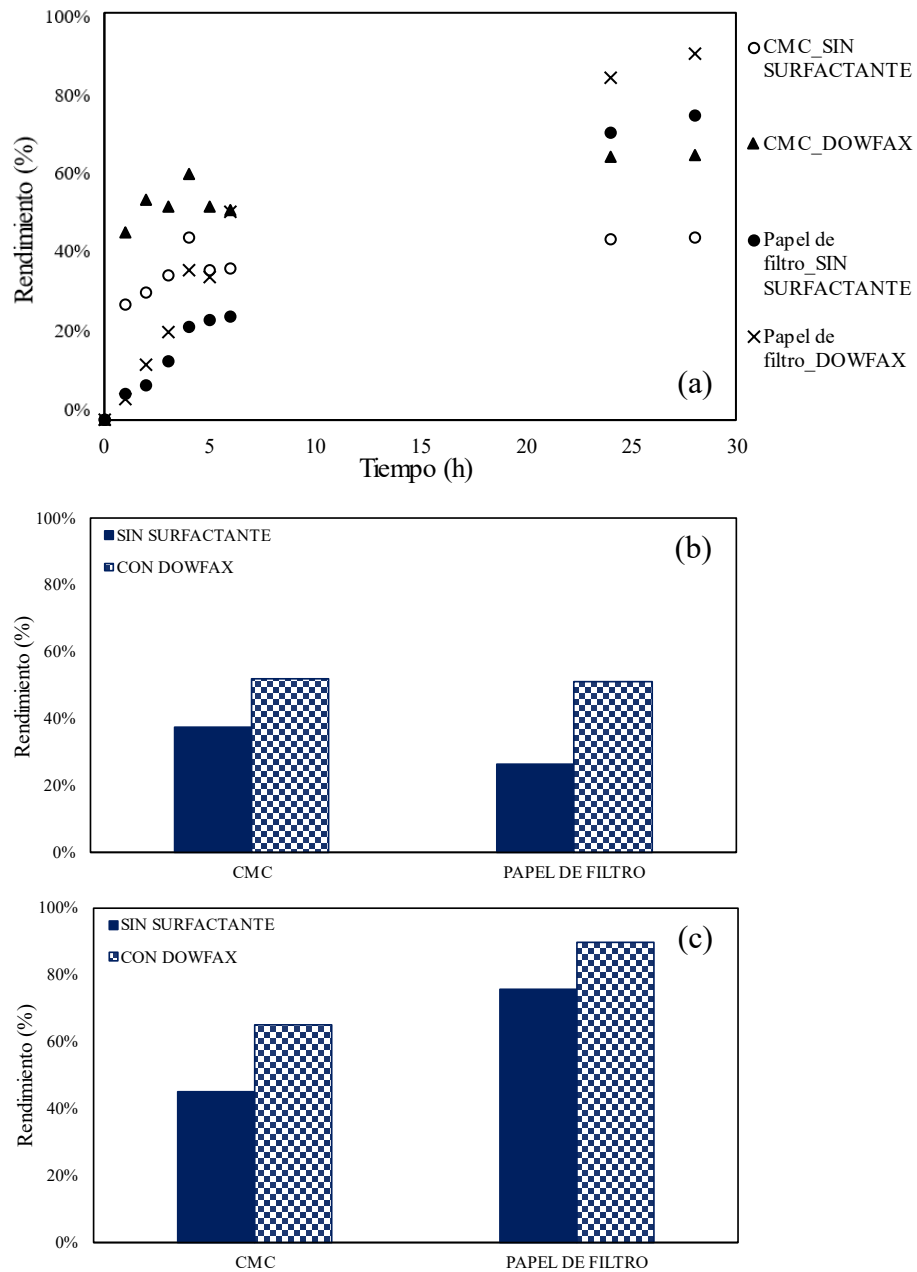


Figura 3.6. Efecto del agregado de Dowfax 63N10 sobre la sacarificación enzimática de CMC y papel de filtro: (a) Evolución temporal del rendimiento de glucosa generada; (b) Rendimiento a las 6 h; (c) Rendimiento a las 28 h.

3.3 Optimización de otros factores que puedan tener influencia en la sacarificación enzimática.

3.3.1 Evaluación de la posibilidad de evitar el uso de buffer

Los resultados presentados en la **Figura 3.7** dejan en evidencia la posibilidad de evitar el uso de buffer durante la sacarificación de papel de filtro con el agregado de Dowfax 63N10. No se observaron cambios significativos en el pH durante la reacción, razón por la cual, ajustando el pH inicial es posible trabajar en la condición óptima sin necesidad de emplear buffer, al menos cuando el sustrato es celulosa pura. Se puede observar que en ambos casos la velocidad inicial es similar, siendo incluso levemente mayor para el caso sin regulación de pH. El rendimiento de glucosa también fue mayor para el ensayo sin agregado de buffer, pasando de 30 a 40% después de 6 h de sacarificación, y de 69 a 77% luego de 28 h.

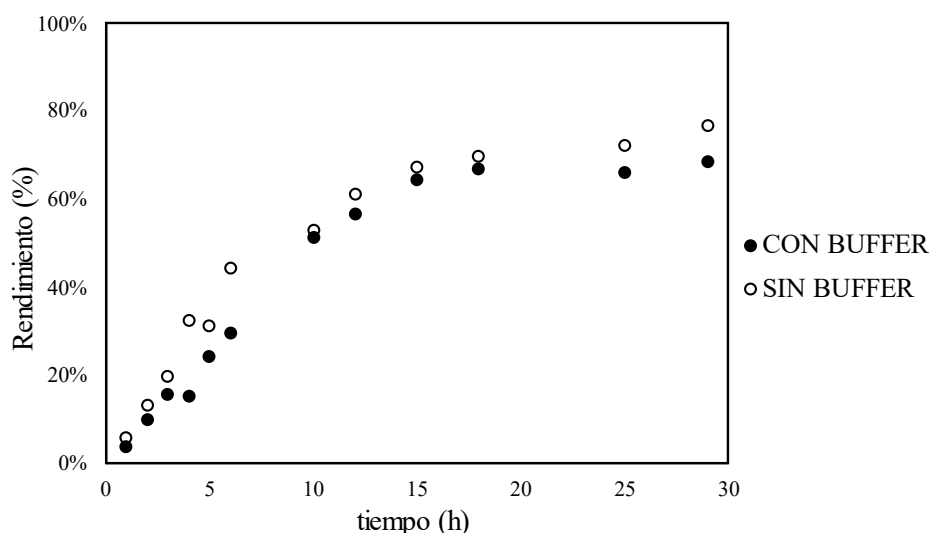


Figura 3.7. Sacarificación de papel de filtro asistido por el agregado de Dowfax 63N10 con y sin regulación de pH. Condiciones experimentales: T= 50°C, pH inicial= 4,75.

3.3.2 Efecto de la agitación y del área interfacial gas-líquido

En base a estudios previos que sugieren que altas velocidades de agitación y grandes interfaces gas-líquido tienen un efecto negativo sobre la hidrólisis enzimática (Lou et al, 2018; Ying et al, 2021b), se decidió hacer pruebas para analizar los efectos de estas variables.

En la **Figura 3.8** se presentan los resultados de la hidrólisis enzimática de papel de filtro, con distintas dosis de surfactante no iónico (Dowfax 63N10). Se observa que el efecto de la concentración de surfactante es mayor para aquellos experimentos llevados a cabo sin agitación. Además, la agitación orbital mejora el rendimiento en todos los casos. Sin embargo, el efecto es menor luego de 28 h de reacción.

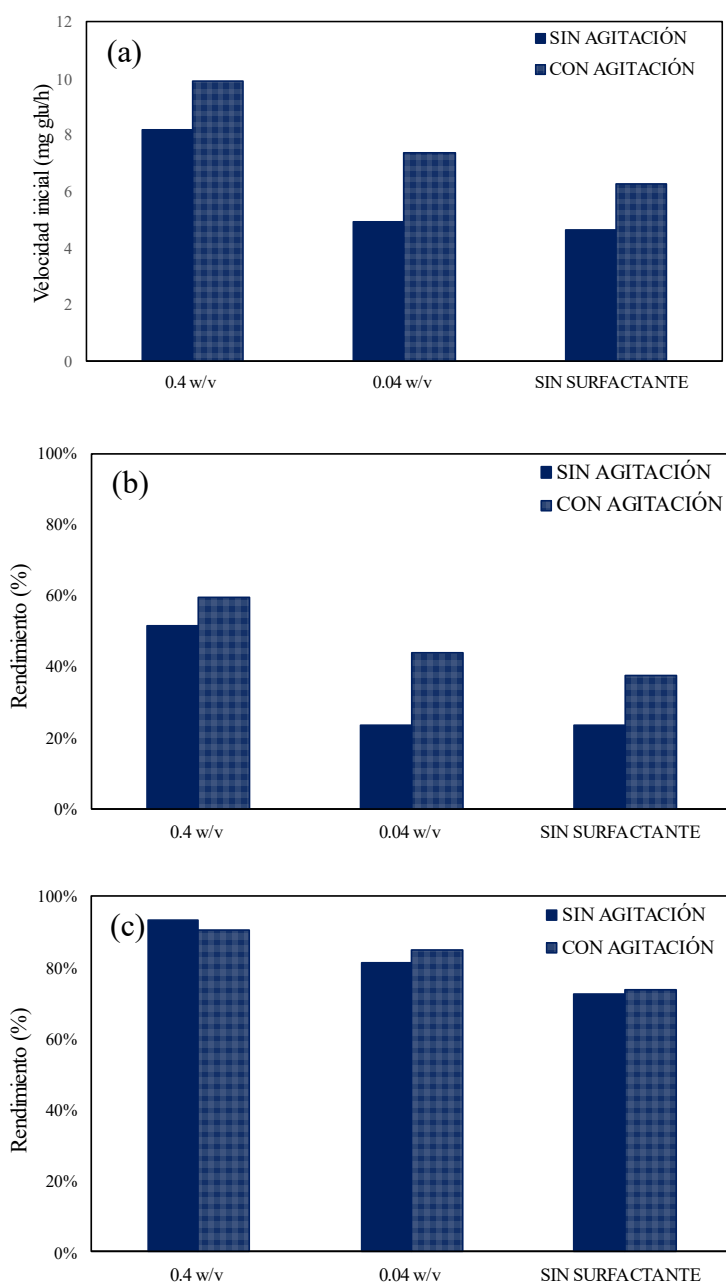


Figura 3.8. Efecto de la agitación sobre la sacarificación de papel de filtro: (a) Velocidad inicial, (b) Rendimiento luego de 6 h, (c) Rendimiento luego de 28 h.

La **Figura 3.9** muestra el efecto del área interfacial gas-líquido. El área interfacial fue modificada realizando los experimentos en Erlenmeyers de 100 y 250ml, ambos con un volumen de líquido de 50ml. Así, se generaron áreas de contacto superficial líquido-gas de 23 y 51cm², respectivamente. Los resultados obtenidos no evidencian una influencia significativa del tamaño del área interfacial gas-líquido en la sacarificación, en contraposición a lo reportado en literatura (Lou et al, 2018).

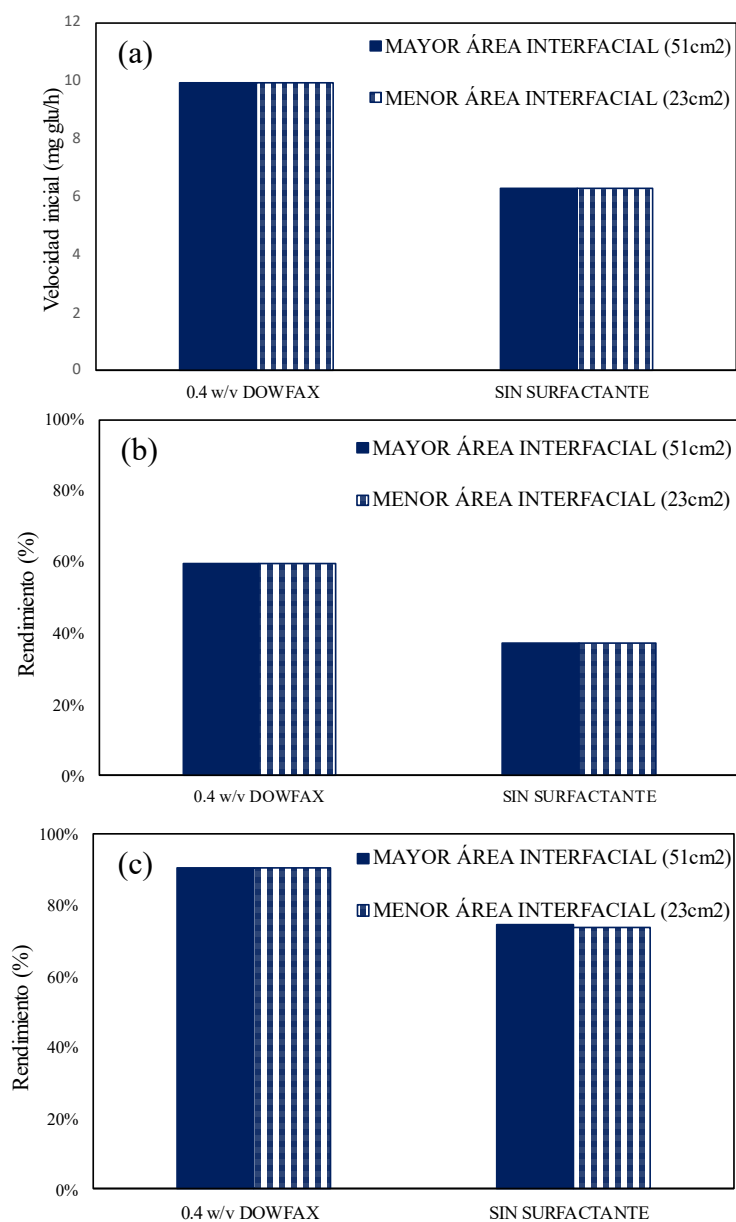


Figura 3.9. Efecto del área interfacial gas-líquido en la sacarificación de papel de filtro: (a) Velocidad inicial, (b) Rendimiento luego de 6 h, (c) Rendimiento luego de 28 h.

3.3.3 Efecto de la relación sólido/líquido

La **Figura 3.10** presenta los resultados correspondientes a la velocidad inicial y rendimiento de la sacarificación de papel de filtro para distintas relaciones sólido/líquido. Se observa que, si bien la velocidad inicial aumenta considerablemente en función a la relación sólido/líquido, el rendimiento al cabo de 6 h es inversamente proporcional a dicha relación. El rendimiento luego de 28 h es similar en todos los casos, esto puede deberse a que en los casos de mayor concentración de sólidos ocurra una posible inhibición de la enzima por producto generado.

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió emplear una relación sólido/líquido de 2 g/L para el resto de las experiencias. Esta carga de sólidos permite estudiar la posibilidad de realizar la sacarificación en recirculación, la cual se vería dificultada con alta proporción de sólidos.

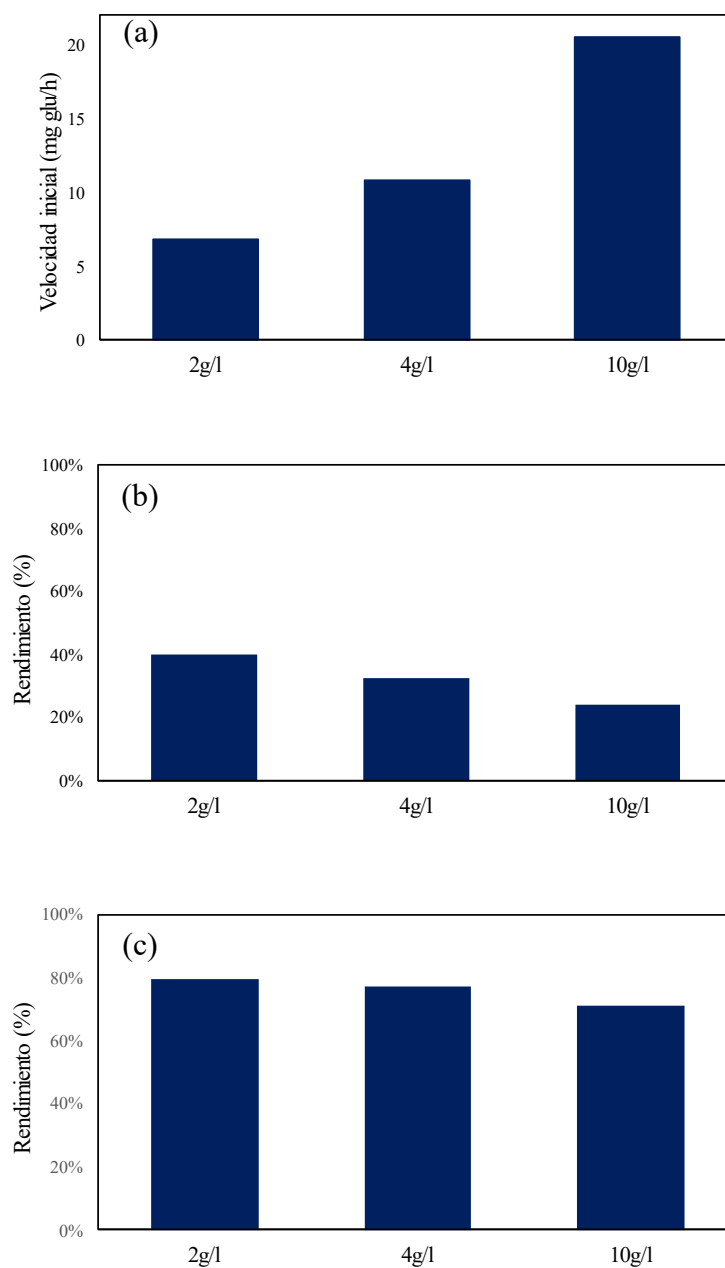


Figura 3.10. Efecto de la relación sólido/líquido en la sacarificación de papel de filtro: (a) Velocidad inicial; (b) Rendimiento luego de 6 h, (c) Rendimiento luego de 28 h.

3.4 Efecto del agregado de surfactantes en la sacarificación de residuos lignocelulósicos

Las **Figuras 3.11 a 3.13** muestran el efecto del agregado de surfactante no iónico sobre la sacarificación de los RLC (residuos lignocelulósicos), sin y con pretratamiento ácido-oxidativo (HPAC) para su delignificación. En este caso, se emplearon hojas de plátano y madera de Eucalipto para realizar los ensayos. El porcentaje de lignina que queda en los RLC luego del pretratamiento por HPAC fue determinado previamente en un trabajo previo (Kildegaard et al., 2022) mediante la norma TAPPI, y es del 14% para las hojas de plátano y resultó despreciable para el Eucalipto. Cabe aclarar que, independientemente de que haya restos de lignina y de hemicelulosa, para el cálculo del rendimiento de glucosa se asumió que la masa inicial del sustrato era 100% celulosa.R

Para los RLC sin pretratamiento, se obtuvieron rendimientos de glucosa despreciables en la sacarificación, que apenas se vieron incrementados por el agregado de surfactantes. Las hojas de plátano delignificadas dieron rendimientos inferiores al 15%, viéndose poco afectadas (e incluso con impacto levemente negativo) por el agregado de surfactantes.

El aserrín de madera de *Eucalyptus sp.* pretratado dio resultados comparables con el papel de filtro, alcanzando rendimientos de alrededor del 80% luego de 28 h de reacción. El agregado de surfactantes no se tradujo en una mejora en la eficiencia de la sacarificación; por el contrario, presentó un efecto levemente negativo.

Para este sustrato también se testeó Tween 80 dado los numerosos resultados positivos presentados en literatura cuando se lo utiliza como aditivo en la sacarificación de biomasa lignocelulósica pretratada (Lv et al., 2022; Ying et al., 2021a; Zhang et al., 2021). Si bien durante las primeras horas de reacción el efecto fue negativo, al cabo de 28 h se observa un aumento de 12% en el rendimiento de glucosa, alcanzando casi un 90% de conversión. Los resultados obtenidos sobre la madera de Eucalipto pretratada con la hidrólisis ácida-oxidativa con HPAC indican que el método de pretratamiento puede tener cierto efecto sobre la influencia de los surfactantes. En consecuencia, es importante evaluar el efecto conjunto del método de pretratamiento y el uso de surfactantes como aditivos de intensificación durante la sacarificación.

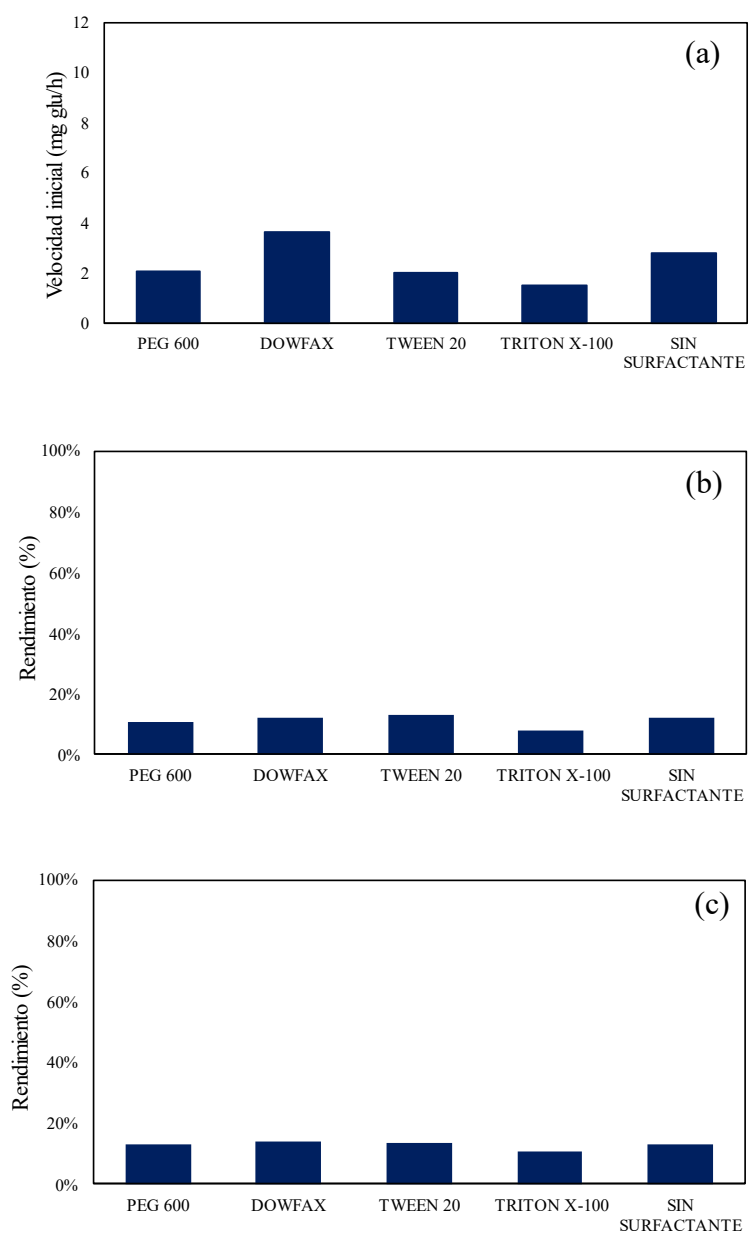


Figura 3.11. Efecto del agregado de distintos surfactantes durante la sacarificación enzimática de hojas de *Platanus acerifolia* delignificadas: (a) Velocidad inicial; (b) rendimiento a las 6 h; (c) Rendimiento a las 28 h.

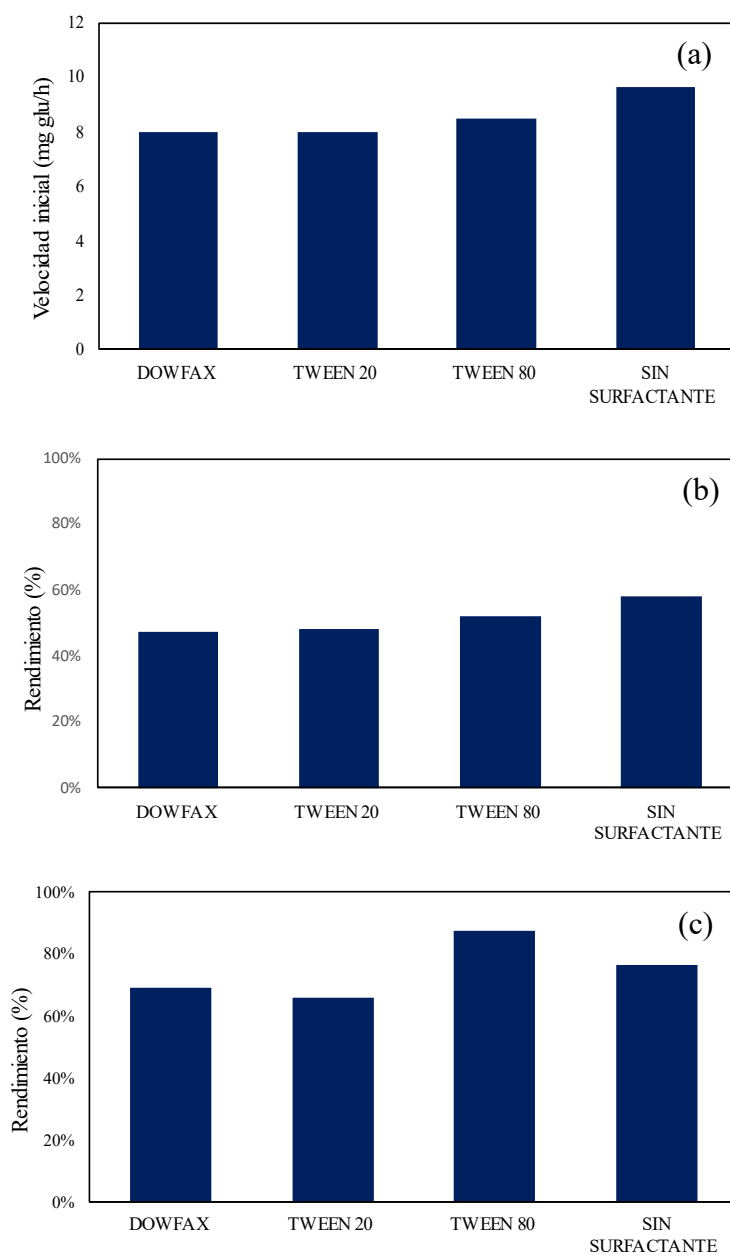


Figura 3.12. Efecto del agregado de distintos surfactantes durante la sacarificación enzimática de *Eucalyptus sp.* delignificado: (a) Velocidad inicial; (b) rendimiento a las 6 h; (c) Rendimiento a las 28 h.

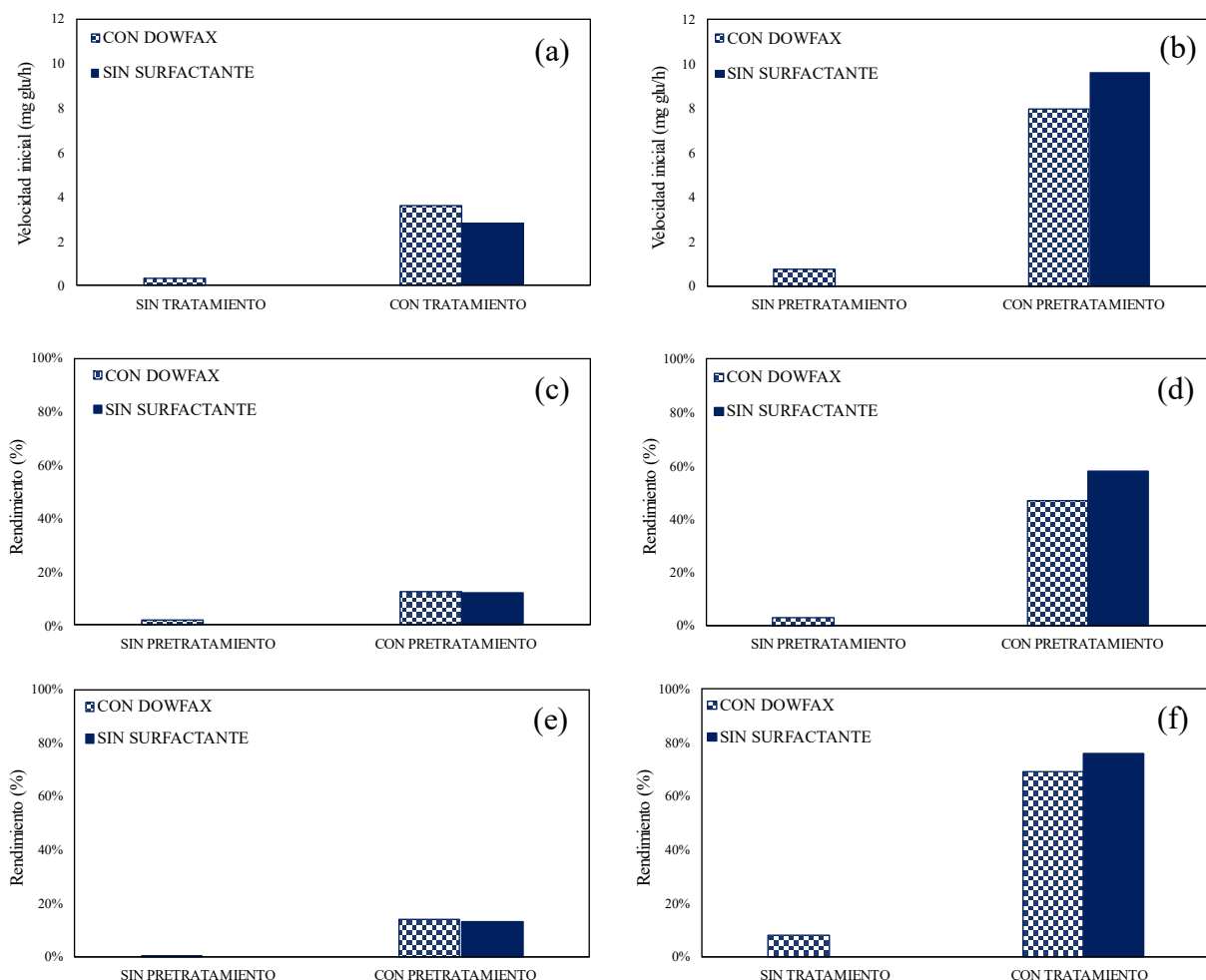


Figura 3.13. Efecto del agregado de Dowfax 63N10 en la sacarificación de RLC. Velocidad inicial para: (a) hojas de *Platanus acerifolia*, (b) *Eucalyptus sp.*. Rendimiento luego de 6 h para: (c) hojas de *Platanus acerifolia*, (d) *Eucalyptus sp.*. Rendimiento luego de 28 h para: (e) hojas de *Platanus acerifolia*, (f) *Eucalyptus sp.*

La contribución beneficiosa del uso de surfactantes como aditivos en la sacarificación de papel de filtro podría asociarse con una mejor dispersión y separación de las fibras de celulosa que forman la estructura del papel, mejorando así la accesibilidad de las fibras para su efectiva degradación enzimática. El aumento significativamente menor en el rendimiento de glucosa observado al agregar surfactantes no iónicos en la sacarificación de CMC señala probablemente una fuerte influencia de la estructura del sustrato. Aunque la CMC se obtiene de celulosa pura, su estructura contiene grupos carboxílicos que pueden interferir tanto con la adsorción de la enzima

sobre el sustrato como con la interacción con el aditivo. La CMC al disolverse en el medio, se disocia y se carga, lo que también podría inhibir la adsorción del surfactante y de la enzima.

En el caso de los RLC, la adición de surfactantes apenas mejoró o incluso afectó negativamente el rendimiento de glucosa alcanzado y la velocidad inicial de la sacarificación, tanto en la biomasa cruda como en la delignificada. Los resultados anteriores obtenidos con sustratos naturales se han explicado principalmente por dos efectos dados por el agregado de surfactantes: la protección de la enzima y la separación de las fibras de celulosa de su entramado. La ausencia de reacción observada para los RLC sin pretratamiento puede explicarse por la oclusión de la celulosa en el tejido vegetal, ya que la lignina cubre y protege las estructuras de celulosa en las plantas (Ning et al., 2021), evitando el acceso de la enzima al sustrato. Además, la lignina tiene un importante efecto inhibitorio sobre la mayoría de las celulasas (Li et al., 2016). De hecho, como se mencionó en el Capítulo 1, Xu et al. (2015) informaron que el Tween 80 pueden disolver la lignina en agua alcanzando concentraciones de más de 70 g de lignina por cada 100 g de disolvente con una relación 0,76:1 de Tween 80: agua en peso. Sin embargo, dado que las enzimas celulolíticas pueden adsorberse sobre la lignina liberada, de todas formas, disminuiría su actividad en el agua (Li et al., 2016). En consecuencia, si se encuentra suficiente lignina, la actividad enzimática total será baja independientemente de la cantidad de tensioactivo añadido, y de que éste disuelva la lignina, porque la misma no ha sido removida del medio.

Si bien los RLC delignificados reaccionaron más rápido que los crudos, la conversión total aún podría haberse visto afectada por la cantidad residual de lignina restante en las hojas de *Platanus acerifolia* pretratadas. El aserrín de *Eucalyptus sp.* pretratado con HPAC contenía una cantidad despreciable de lignina y produjo altos rendimientos de glucosa, lo que indica una estructura ya muy abierta y accesible alcanzada con el pretratamiento. La conversión comparativamente menor encontrada para las hojas delignificadas, versus el papel filtro y el aserrín pretratado puede atribuirse, por lo tanto, a la oclusión de las fibras de celulosa dentro de la pared celular vegetal y de la estructura del tejido, y/o al efecto inhibitorio de la lignina remanente. La acción del surfactante implicaría tanto la mejora de la adsorción/desorción de la enzima desde los sitios de reacción, como la separación y exposición de las fibras de celulosa a la enzima (da Costa Nogueira et al., 2022; Li et al., 2016).

En resumen, de acuerdo a los resultados obtenidos, el efecto de los tensioactivos no iónicos sobre la sacarificación de los RLC pretratados con HPAC fue menor debido, probablemente, a la lignina residual, en el caso de las hojas de *Platanus acerifolia*, y a una estructura lo suficientemente accesible a la enzima luego del pretratamiento para el caso del *Eucalyptus sp.*. En consecuencia, el uso de un surfactante para mejorar las condiciones de hidrólisis enzimática debe ser analizado para cada RLC en particular, evaluando la relación costo/beneficio dado el costo de estos insumos y que no siempre conducen a una mejora significativa de la eficiencia en la sacarificación. Además, la masa que se requiere agregar es significativa, en algunos casos del orden de la masa de sustrato, y queda en solución, por lo cual también debería analizarse su efecto sobre la fermentación para la cual se utilizará la glucosa generada.

Capítulo 4 : Intensificación de la sacarificación aplicando cavitación hidrodinámica durante la etapa de lavado

En este capítulo se presentan los resultados de los experimentos orientados a analizar la posibilidad de intensificar la producción de glucosa por hidrólisis enzimática mediante la aplicación de cavitación hidrodinámica sobre el sólido que se pretende sacarificar. En el caso de residuos lignocelulósicos (RLC), el sólido es el que resulta del proceso HPAC al que fueron sometidos para eliminar convenientemente la lignina. Dado que los RLC empleados provienen de distintas especies vegetales, en primer lugar, se presenta una caracterización de dichos RLC con el fin de tener más herramientas para interpretar los resultados de rendimiento de glucosa obtenidos. Luego, se detallan los resultados de la hidrólisis, comparando cada tratamiento con los resultados de la sacarificación de papel de filtro, utilizada como referencia.

Como se detalló en el Capítulo 2, luego de la etapa de delignificación, todos los RLC fueron sometidos a los diferentes procedimientos de lavado descriptos. El objetivo fue determinar si el método de intensificación utilizado durante la etapa de lavado ocasiona efectos positivos sobre el rendimiento y la velocidad inicial en la etapa de sacarificación. En el caso del papel de filtro, si bien el mismo no requiere de una etapa de lavado previa a la hidrólisis enzimática, también fue sometido a los mismos procedimientos, a fin de analizar los posibles efectos sobre las fibras, independientemente de que no habría restos de licor o compuestos tóxicos que pueden quedar en los RLC luego del pretratamiento por HPAC.

En el caso de los procedimientos de lavado que incluyen cavitación hidrodinámica, para el papel de filtro se hicieron lavados con agua destilada sin ningún agregado, y otros incorporando H_2O_2 en distintas concentraciones. Esto se debe a que, como se mencionó en el Capítulo 1, la cavitación hidrodinámica se ve intensificada por el agregado de H_2O_2 . En el caso de los RLC pretratados por HPAC, siempre hay presencia de H_2O_2 durante el lavado pues dicho reactivo se utiliza durante la hidrólisis ácida-oxidativa, quedando siempre un remanente en el sólido.

4.1 Caracterización de los sustratos

4.1.1 Morfología y Composición de los RLC empleados

Al proceder de distintas especies vegetales, las maderas utilizadas en este trabajo poseen diferentes estructuras a nivel microscópico. Las diferencias se pueden explicar a partir de su clasificación e influyen significativamente sobre la circulación de los fluidos dentro de la matriz lignocelulósica. La **Figura 4.1** esquematiza la estructura de los sistemas de circulación en las distintas especies. El *Eucalyptus sp.* y la *Tipuana tipu* pertenecen a la familia de las latifoliadas (angiospermas dicotiledóneas, coloquialmente llamadas frondosas porque tienen mucho follaje), mientras que el *Pinus sp.* pertenece a las coníferas (tipo de gimnosperma). Una de las principales diferencias es la estructura anatómica de la madera (xilema de crecimiento secundario). Las especies latifoliadas presentan una estructura compleja y con gran variedad de elementos, y se diferencian de las coníferas por poseer vasos o haces conductores. Los vasos son células del xilema cuyas paredes finales (responsables del contacto entre elementos de uno y otro vaso) carecen de membranas. Estas células se ubican superpuestas de manera vertical, formando una estructura tubiforme continua de largo indeterminado cuya función es la de conducción de líquidos en el tejido vegetal (Fig. 4.1 b). Por el contrario, el xilema de las coníferas está constituido en un 95% de su volumen por traqueidas axiales, que son células alargadas y estrechas, de extremos más o menos puntiagudos. La función principal de las traqueidas es la de conducción y sostén, y sus paredes presentan puntuaciones areoladas a través de las cuales los líquidos pasan de una célula a otra (Fig. 4.1 a). Por lo general, los vasos de las latifoliadas son de mayor diámetro que las traqueidas. Como consecuencia de la estructura que poseen, el sistema de circulación de las latifoliadas es más eficiente que el de las coníferas, en términos de la pérdida de carga asociada al flujo de agua.

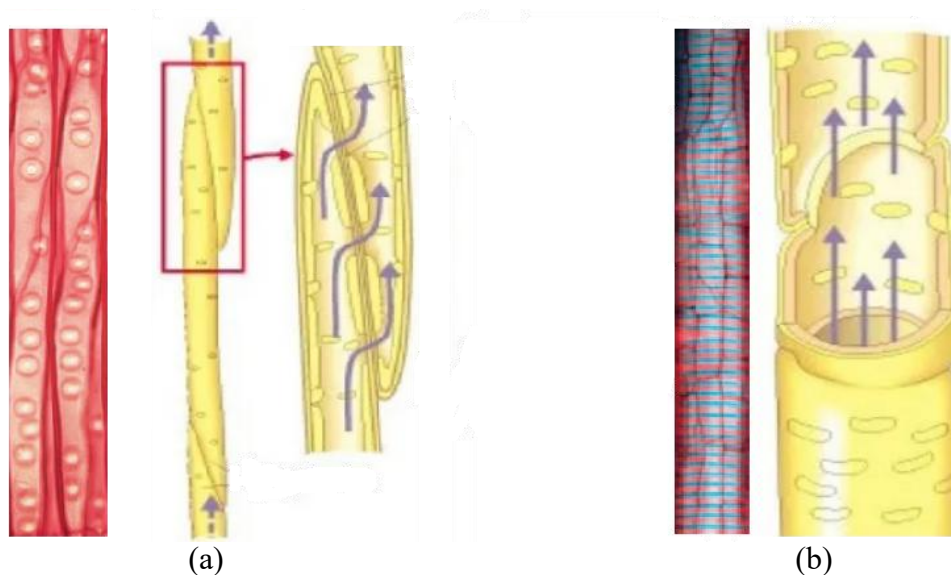


Figura 4.1. Esquema de los sistemas de circulación: a. Traqueidas (coníferas); b. Vasos conductores (latifoliadas). Reformulado a partir de Berg (2008) y Benaiges (2019).

El xilema es un tejido heterogéneo compuesto por células organizadas en diferentes direcciones. Es por eso que el aspecto de la madera varía según el plano de observación. Para realizar estudios anatómicos, se establecen los siguientes planos convencionales de corte: corte transversal (perpendicular al eje del tronco), corte radial (paralelo a los radios) y corte tangencial (tangente a los anillos de crecimiento o perpendicular a los radios) (**Figura 4.2**).

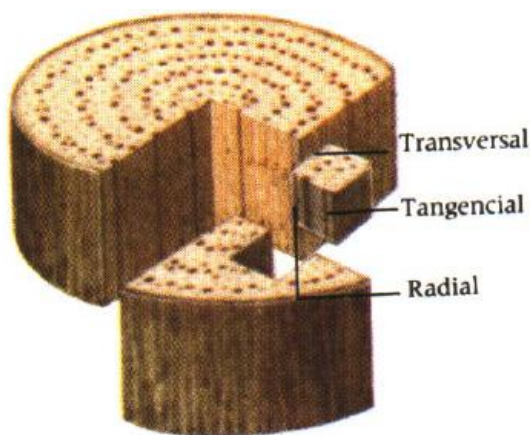


Figura 4.2. Obtención de un cubo a partir de los tres cortes anatómicos (Giménez, 2005).

La **Figura 4.3** muestra cómo se observan las estructuras de las maderas de coníferas (Fig 4.3 a) y de latifoliadas (Fig. 4.3 b) cuando se obtiene un cubo como consecuencia de realizar los tres cortes anatómicos. Cabe destacar que, como el objetivo de esta tesis no es realizar un análisis anatómico, los cortes que fueron inspeccionados por microscopía en este trabajo son el simple resultado de la trituración y molienda a los que fueron sometidos los RLC. Al no realizar cortes anatómicos de forma controlada, al momento de observar las estructuras por microscopía, nos encontramos con cortes de distinto tipo en direcciones arbitrarias.

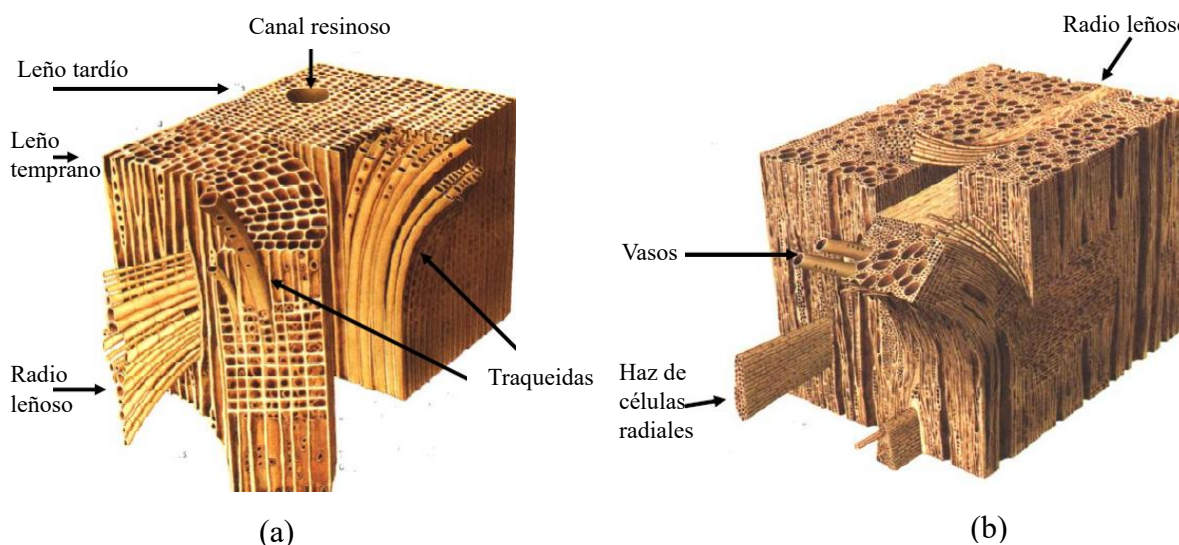


Figura 4.3. Aspecto microscópico de la madera. (a) Coníferas. (b) Latifoliadas (Giménez, 2005).

La **Figura 4.4** presenta las imágenes de microscopía SEM de los distintos RLC crudos (sin pretratamiento). Estas imágenes resultan útiles para observar la morfología de los sustratos, y servirán para contrastar con aquellas obtenidas para los sólidos sometidos a los distintos procesos de pretratamiento. En todos los casos, se observan estructuras compactas, donde no se distinguen fibras separadas y cuyas superficies son mayormente lisas. Los cortes no han sido cortes anatómicos sino muestras al azar resultantes del proceso de triturado y molienda, por lo cual no es claramente distinguible alguna parte estructural específica.

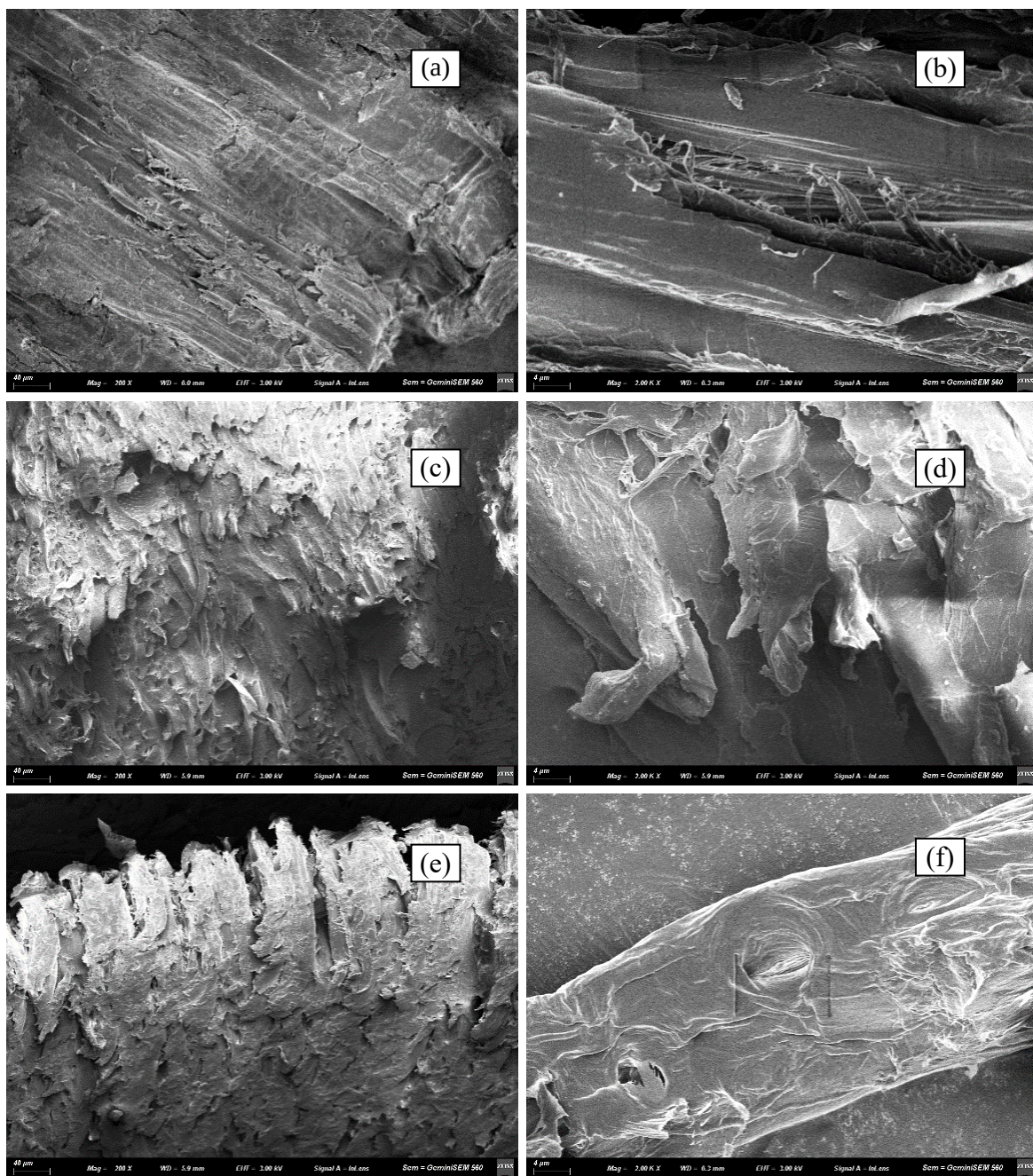


Figura 4.4. Imágenes de la microscopía SEM de los sustratos sólidos. (a), (b) *Eucalyptus sp.*; (c), (d) *Tipuana tipu*; (e), (f) *Pinus sp.*. Magnificación: a la izquierda x200 (escala indicada de 40 μm) y a la derecha x2000 (escala indicada de 4 μm).

En las **Figuras 4.5** y **4.6** se pueden observar las imágenes de la microscopía óptica de tinción de los sustratos crudos (sin pretratamiento). Para las tres especies vegetales (Fig, 4.6) es notorio el color púrpura, que indica la presencia de lignina, a diferencia de lo que ocurre con el papel de filtro

(Fig. 4.5) que se ve completamente incoloro. Por otro lado, en el papel de filtro se observan las fibras bien separadas, mientras que el *Eucalyptus sp.*, la *Tipuana tipu* y el *Pinus sp.* presentan estructuras más compactas, sin poder distinguir fibras disgregadas.

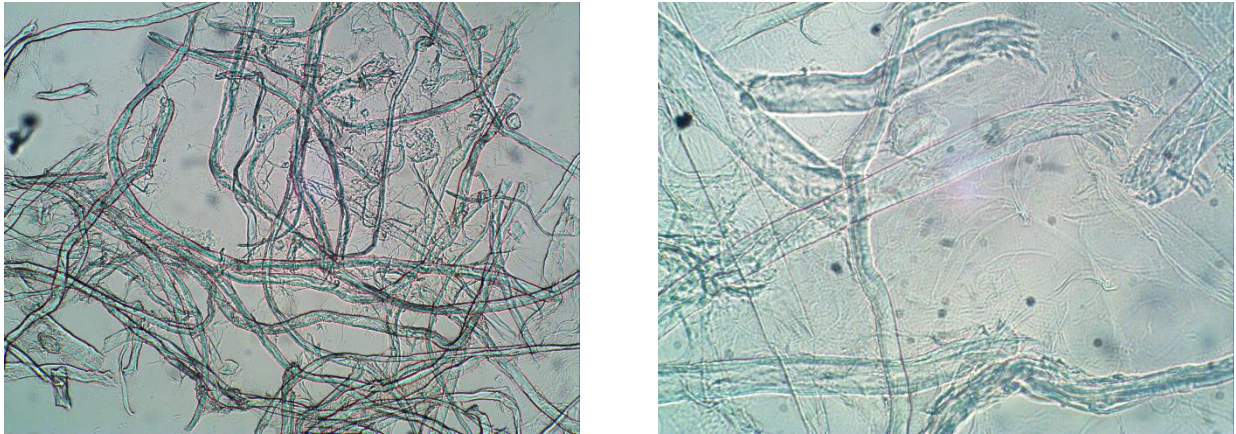


Figura 4.5. Imágenes de la microscopía óptica de Papel de filtro. Magnificación: a la izquierda x10 (escala 187:1) y a la derecha x40 (escala 735:1).

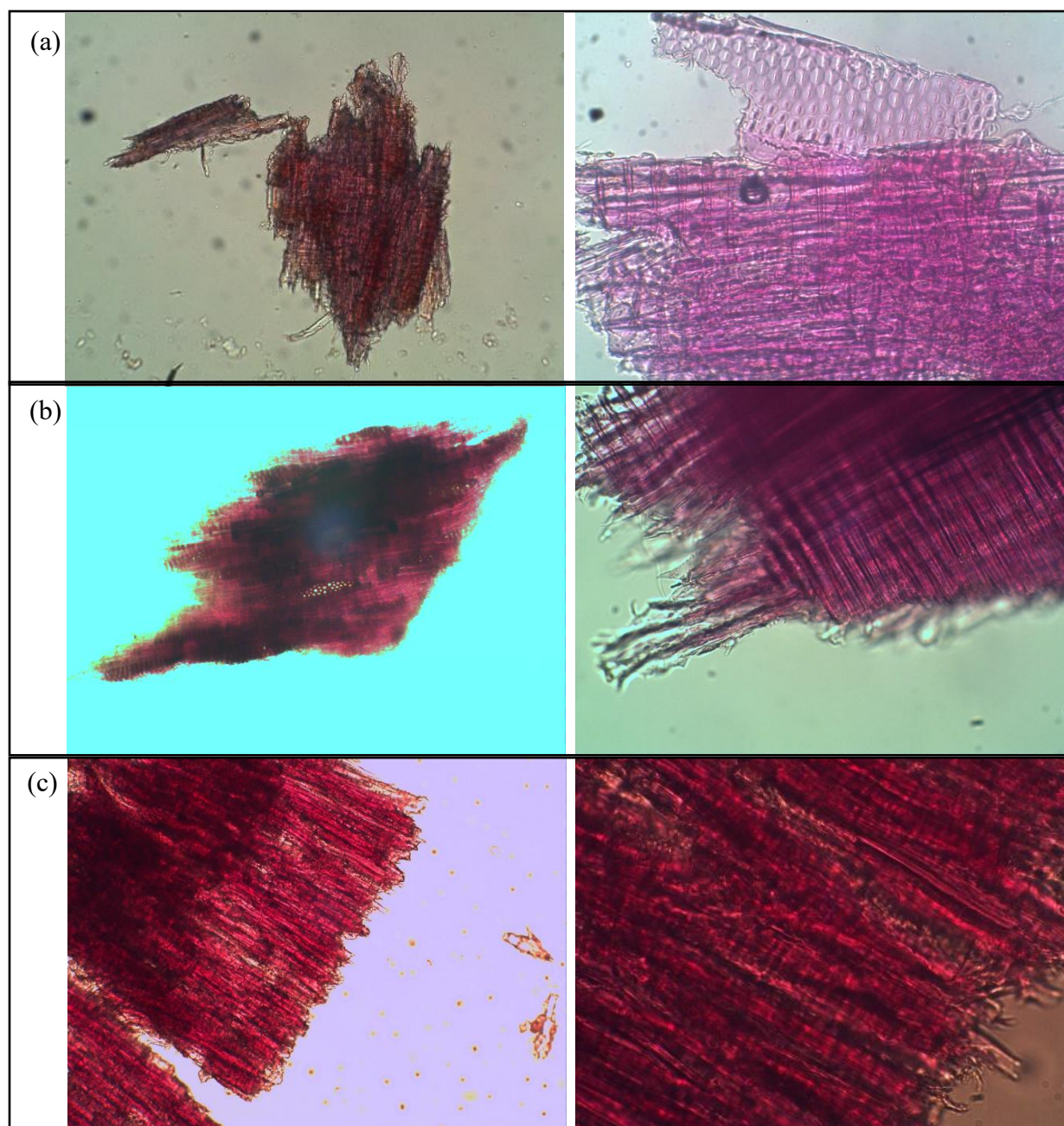


Figura 4.6. Imágenes de la microscopía óptica de los RLC. (a) *Eucalyptus sp.*; (b) *Tipuana tipu*; (c) *Pinus sp.*. Magnificación: a la izquierda x10 (escala 187:1) y a la derecha x40 (escala 735:1).

En primera instancia se midió el contenido de lignina para las muestras de *Eucalyptus sp.* y las hojas de *Platanus acerifolia* mediante el método químico T222 de las normas TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry). La madera de *Eucalyptus sp.* tiene un 24% de lignina, mientras que las hojas de *Platanus acerifolia* tienen un 44% (Kildegaard et al., 2022). Si bien este

método es útil para estimar el contenido de lignina para todos los RLC, requiere de gran cantidad de masa. Como el objetivo de este trabajo es encontrar estrategias de intensificación de las etapas de pretratamiento, es necesario determinar el contenido de lignina de sustratos crudos y post tratamientos. Y, dado que luego de los procesos de pretratamiento la masa de sólido remanente es limitada y se necesita para someterla a la etapa de hidrólisis enzimática, se decidió recurrir a técnicas instrumentales como la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para estimar aproximadamente el contenido de lignina. Hay numerosos trabajos que relacionan determinadas bandas del espectro IR con el contenido de lignina, particularmente aquellas que tienen en cuenta las vibraciones de los anillos aromáticos (que aparecen a un número de onda cercano a 512 cm^{-1}), que no están presentes en la celulosa (Javier-Astete et al., 2021; Santos et al., 2015; Wittner et al., 2023). La estimación por FTIR del contenido de celulosa presenta mayor error, dado que las bandas cuyas señales se relacionan con ella, también incluyen a la lignina y a la hemicelulosa (son longitudes de onda asociadas a vibraciones y/o estiramientos de enlaces o grupos funciones presentes en los tres componentes). Es por este motivo que se decidió considerar a todos los sustratos delignificados como si fuesen puramente celulosa al momento de estimar los rendimientos de glucosa de las sacarificaciones enzimáticas, por lo que no es posible que se alcance un rendimiento del 100%. La **Tabla 4.1** presenta el contenido de lignina de los RLC crudos, estimados en algunos casos a partir de la norma TAPPI y en otros a partir de los espectros de FTIR, teniendo en cuenta la relación con la estimación por vía húmeda. Las figuras correspondientes a los espectros se presentarán más adelante comparativamente con las de los sustratos pretratados, resaltando la zona considerada para la estimación del contenido de lignina.

Tabla 4.1. Contenido de lignina de los RLC crudos, estimada a partir de la norma TAPPI o de espectroscopía FTIR.

Sustrato	Contenido de lignina (%)
<i>Eucalyptus sp.</i> *	24
<i>Tipuana tipu</i> **	29
<i>Pinus sp.</i> **	34
<i>Platanus acerifolia</i> *	44

* determinadas por norma TAPI T222

** determinada a partir de FTIR considerando los resultados de *Eucalyptus sp.*

4.1.2 Cristalinidad

A partir de los resultados de difracción de rayos X (DRX) realizados sobre los sustratos, cuyos espectros se presentan en la **Figura 4.7**, se determinó el índice de cristalinidad de los mismos como se describió en el Capítulo 2, según la ecuación (2.1). La **Tabla 4.2** detalla estos resultados. Puede verse que el papel de filtro presenta el mayor índice de cristalinidad lo cual es razonable dado que se trata principalmente de fibras de celulosa purificadas y entrelazadas. El resto de los sustratos presentan picos de menor intensidad en la zona cristalina de la celulosa probablemente debido a un menor porcentaje de celulosa en su composición.

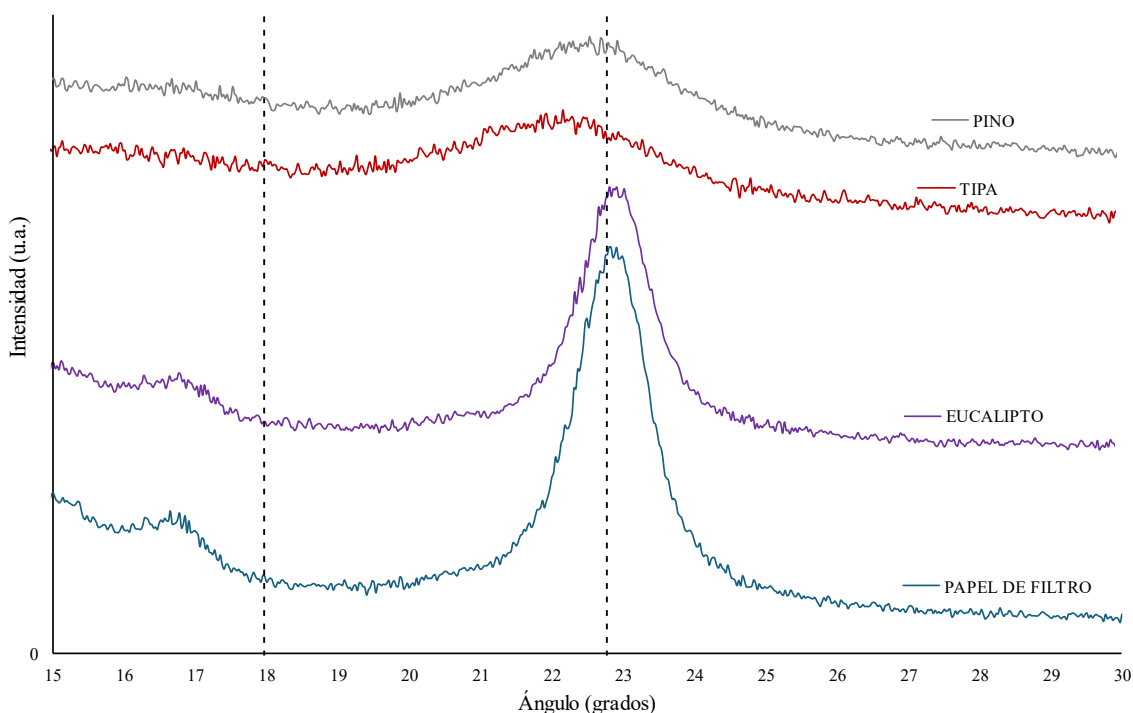


Figura 4.7. Espectros obtenidos por DRX de los sustratos crudos (sin pretratamiento). Las líneas punteadas indican el ángulo de $\theta=22.5^\circ$ cercana al pico cristalino a partir del cual se toma la intensidad de la celulosa cristalina y $\theta=18^\circ$ cercana al valle donde se determina la intensidad relacionada con la celulosa amorfa, ambas según el método de Segal et al. (1959).

Tabla 4.2. Índice de cristalinidad de los sustratos sólidos sin pretratamiento.

Sustrato	Índice de cristalinidad (%)
Papel de filtro	82,4
<i>Eucalyptus sp.</i>	53,2
<i>Tipuana tipu</i>	30,8
<i>Pinus sp.</i>	38,3

4.1.3 Determinación de humedad

La **Tabla 4.3** presenta la humedad promedio de 5 mediciones realizadas para cada uno de los sustratos sólidos estudiados. Todas estas medidas fueron realizadas sobre los sustratos crudos luego de ser molidos y sin ningún tipo de pretratamiento, a excepción de las hojas de plátano que debieron ser humectadas para lograr una molienda relativamente uniforme. Es por esta razón que su contenido de humedad no resulta comparable a la del resto de los sustratos, pero es la condición en la cual la muestra fue almacenada y en consecuencia el punto de partida para los subsiguientes experimentos.

Tabla 4.3. Contenido de humedad de los sustratos sólidos crudos.

Sustrato	Humedad (%)
Papel de filtro	4,8
<i>Eucalyptus sp.</i>	8,6
<i>Tipuana tipu</i>	11,4
<i>Pinus sp.</i>	9,1
<i>Platanus acerifolia</i>	76,1

4.2 Sacarificación de los sustratos sometidos a un procedimiento de lavado intensificado por cavitación hidrodinámica, sin circulación de sólido

4.2.1 Efecto de la intensificación del lavado sobre la sacarificación de un sustrato modelo

La **Figura 4.8** evidencia el efecto de los distintos procedimientos de lavado del papel de filtro sobre su sacarificación. Se incluyen los resultados de sacarificar el papel de filtro “crudo” (sin lavar ni mojar) como referencia. Se observa que todos los procedimientos de lavado tienen un efecto positivo sobre la posterior hidrólisis enzimática. Para las muestras que fueron sometidas a cavitación hidrodinámica (HC), los efectos fueron visiblemente positivos y mayores para aquellas en las que se agregó H_2O_2 . La influencia se observó tanto sobre los rendimientos como sobre las velocidades iniciales. Sin embargo, se observaron resultados similares entre las muestras que solamente fueron inmersas en agua destilada durante una hora, y aquellas que fueron cavitadas con H_2O_2 . En consecuencia, los resultados indican un efecto significativo y predominante del grado de humectación del sustrato.

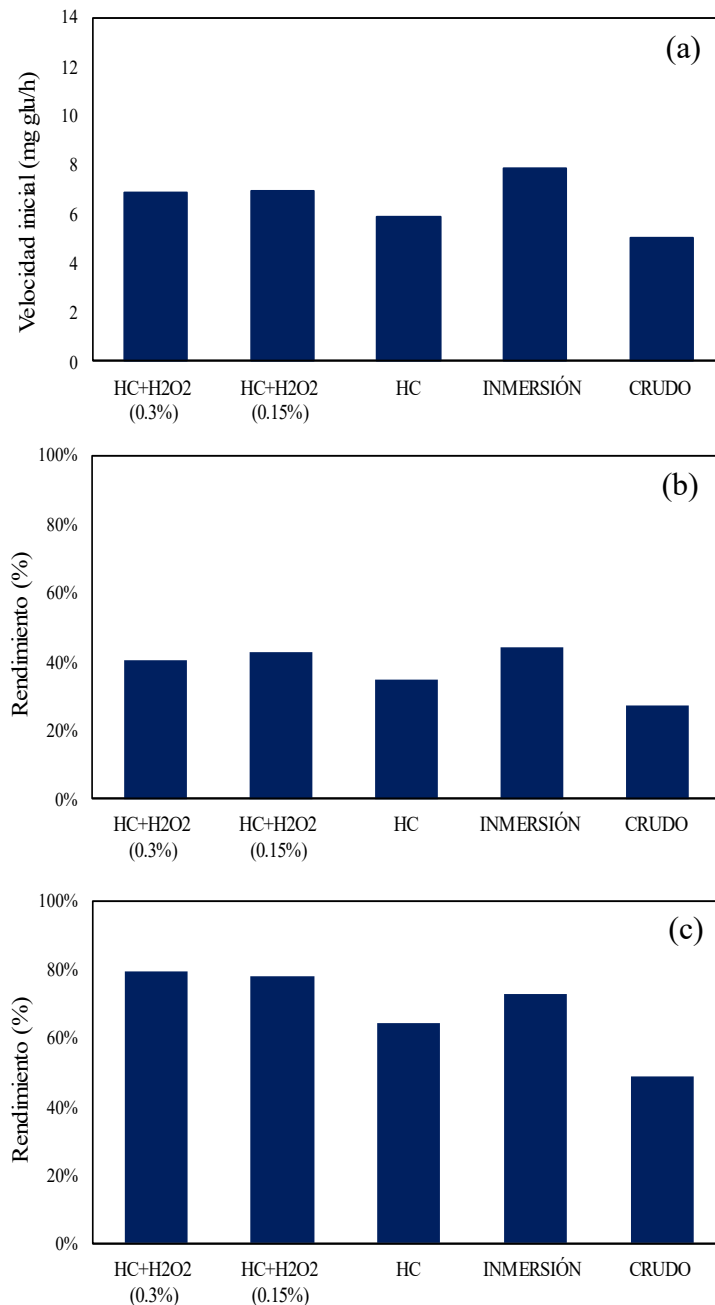


Figura 4.8. Comparación del efecto de los distintos procedimientos de lavado sobre la sacarificación enzimática de papel de filtro. (a) Velocidad inicial. (b) Rendimiento de glucosa luego de 6 h. (c) Rendimiento de glucosa luego de 28 h. “Crudo” indica el papel de filtro sin lavar ni mojar.

El rendimiento obtenido para papel de filtro crudo al cabo de 28 h de sacarificación fue del 49% y se incrementó a 73% al sumergir el papel en agua durante una hora previo a la hidrólisis

enzimática. La intensificación del lavado por cavitación hidrodinámica condujo a mayores rendimientos (alrededor del 80%) sólo cuando se agregó H_2O_2 al agua de lavado. Este efecto prácticamente no depende de la concentración de H_2O_2 en el rango estudiado, pasando del 78% al 80% al aumentar la concentración de agua oxigenada de 0,15% a 0,30% p/p. El papel de filtro puede ser considerado celulosa pura porque no contiene lignina remanente ni inhibidores generados en una etapa de pretratamiento que afecten la actividad enzimática. Por lo tanto, el motivo por el cual el rendimiento aumenta podría deberse fundamentalmente a modificaciones en la estructura o morfología de las fibras de celulosa. La cavitación hidrodinámica promueve tanto la disgregación física de materiales por esfuerzos de corte y ondas de choque, como la formación de radicales hidroxilo, y su velocidad de generación se incrementa aún en presencia de bajas concentraciones de H_2O_2 . Entonces, el efecto de intensificar el lavado por HC sobre la posterior etapa de hidrólisis probablemente se deba a la separación y disgregación de las fibras de celulosa, aumentando su accesibilidad para la enzima.

Con el fin de analizar el efecto de la HC sobre la morfología de las muestras, las mismas fueron examinadas por microscopía SEM; los resultados se ilustran en la **Figura 4.9**. Observando las muestras humectadas con o sin haber empleado HC para intensificar la etapa de lavado (Fig. 4.9 a y b), se infiere que tienen una superficie rugosa y una matriz abierta, lo que permite la entrada y adsorción de la enzima. Cuando se agrega peróxido de hidrógeno durante la intensificación del lavado por HC, las fibras de celulosa se vuelven más finas y la superficie se arruga aún más (Fig. 4.9 c), mejorando la accesibilidad de la matriz (mayor superficie específica).

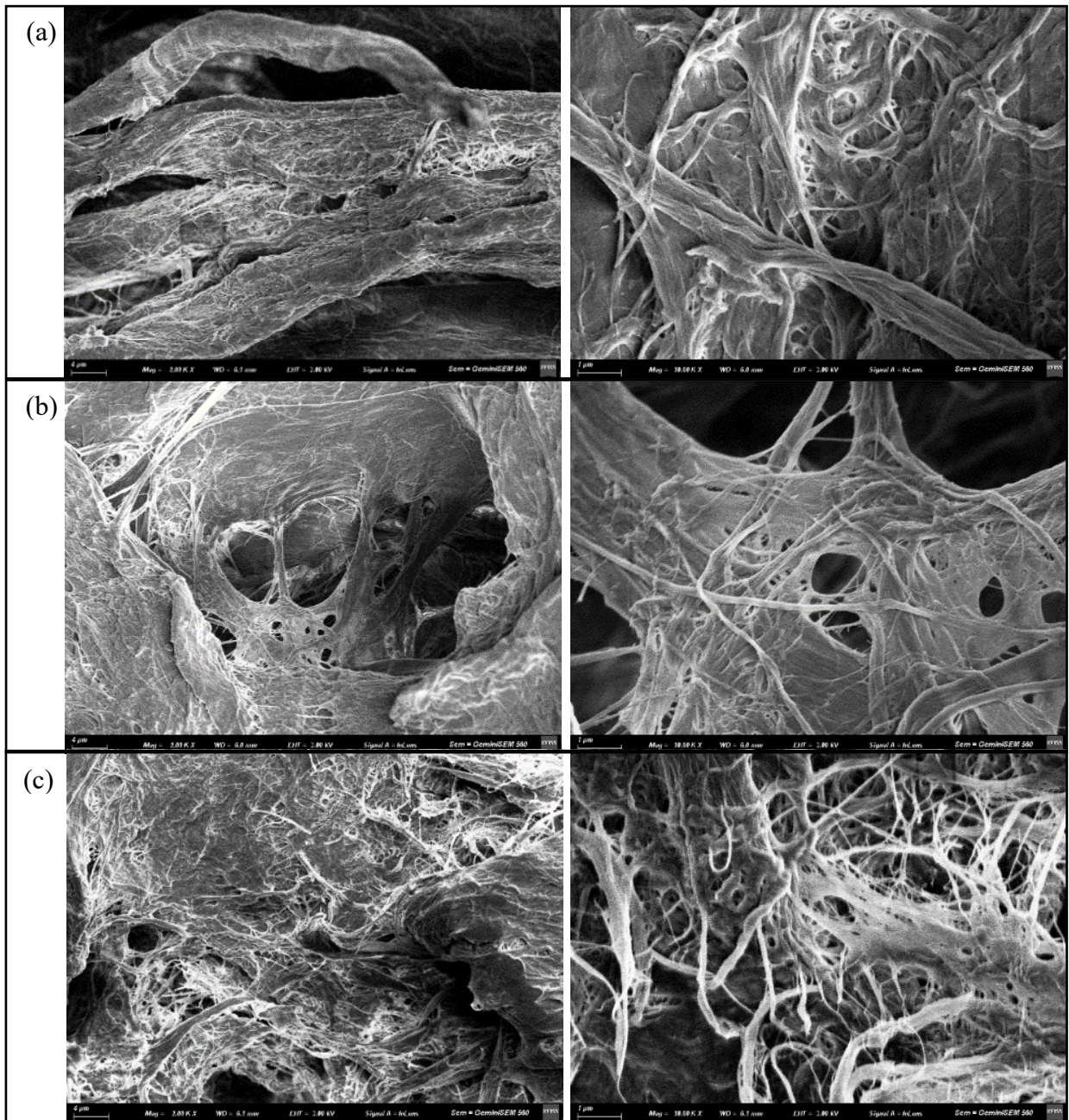


Figura 4.9. Microscopía de barrido electrónico (SEM) de papel de filtro sometido a distintos procedimientos de lavado. (a) Lavado por inmersión, (b) Lavado en recirculación intensificado por cavitación hidrodinámica (c) Lavado en recirculación intensificado por cavitación hidrodinámica con adición de H_2O_2 (0.3%). Magnificación aproximada: x2000 (izquierda) y x10000 (derecha).

4.2.2 Efecto de la intensificación del lavado sobre la sacarificación de residuos lignocelulósicos

4.2.2.1 Hojas de plátano (*Platanus acerifolia*)

Los resultados de la sacarificación de hojas crudas y delignificadas de *Platanus acerifolia*, sometidas a distintos procedimientos de lavado, se presentan en la **Figura 4.10**. Las hojas sin pretratamiento dieron una velocidad de sacarificación muy baja, alcanzándose rendimientos de glucosa de sólo el 5% al cabo de 6 h, sin observarse aumentos durante las horas posteriores. Cabe recordar que, como se detalló en el Capítulo 2, los rendimientos se calculan en base a la masa seca de sólido, asumiendo que el sólido sólo contiene celulosa.

Para las hojas que fueron sometidas a hidrólisis ácida-oxidativa con HPAC, se observa un incremento significativo en la velocidad inicial y aumentos en el rendimiento que llegaron al 15% a las 6 h para aquellas muestras que fueron lavadas por inmersión y en recirculación sin cavitación hidrodinámica. Las muestras que luego de la hidrólisis ácida-oxidativa fueron lavadas en recirculación intensificada con cavitación hidrodinámica alcanzaron un rendimiento del 22% luego de 6 h. El incremento más significativo se observó en la velocidad inicial de reacción duplicando su valor respecto de las muestras lavadas con los otros procedimientos, e incluso alcanzado valores similares a los obtenidos para la sacarificación de papel de filtro crudo. Sin embargo, la velocidad de sacarificación disminuyó notablemente para todas las muestras luego de las primeras 6 h, alcanzándose un rendimiento de sólo el 25% luego de 28 h para las muestras cavitadas, y de alrededor del 20% para las sometidas a los otros procedimientos de lavado.

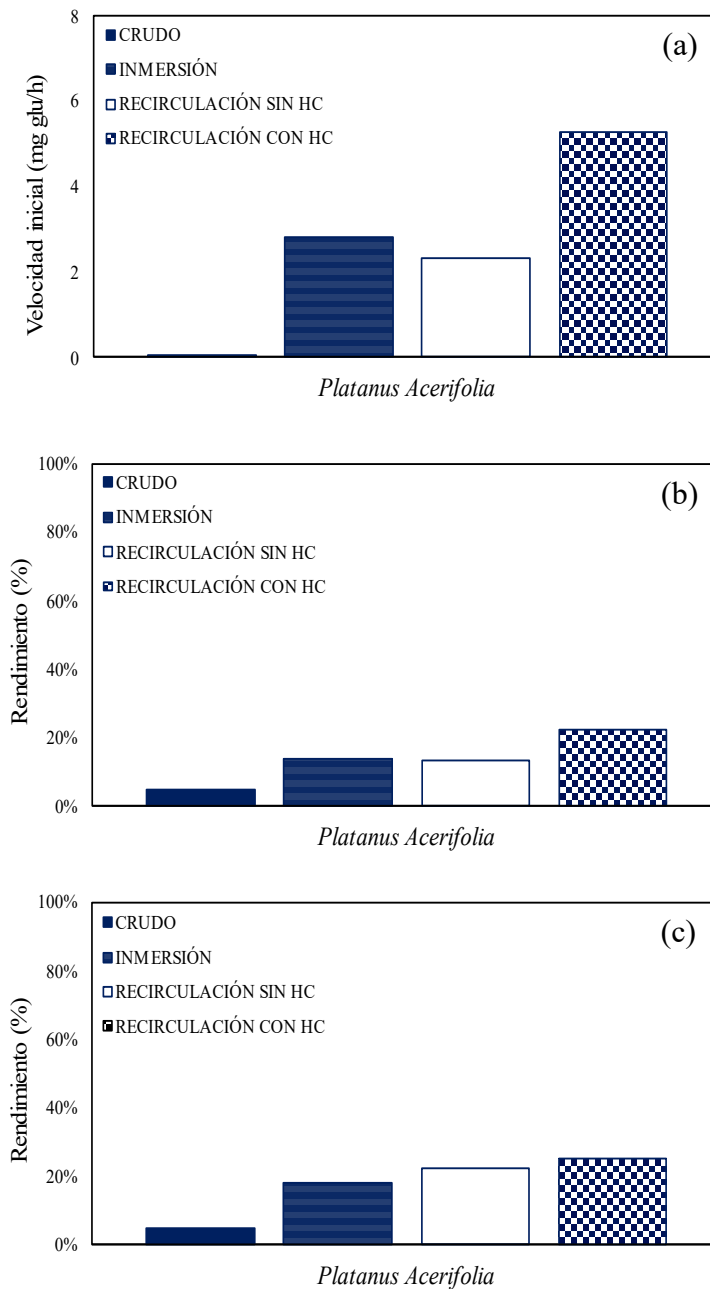


Figura 4.10. Comparación del efecto del procedimiento de lavado sobre la sacarificación de hojas de *Platanus acerifolia*. (a) Velocidad inicial. (b) Rendimiento de glucosa luego de 6 h. (c) Rendimiento de glucosa luego de 28 h.

Si bien la delignificación con HPAC seguida del lavado intensificado con cavitación llega a quintuplicar el rendimiento de glucosa durante la sacarificación, no resulta suficiente para contrarrestar completamente el efecto perjudicial de la lignina remanente en el sólido, que era de

alrededor del 14% para las hojas pretratadas (Kildegaard et al., 2022). Como se ha mencionado en el Capítulo 1, el pretratamiento por HPAC, una hidrólisis ácida oxidativa utilizando ácido acético y agua oxigenada, es especialmente útil para delignificar maderas (Wi et al., 2015). En consecuencia, para continuar el estudio de la eficiencia de intensificar la etapa de lavado luego del pretratamiento con HPAC, se decidió utilizar residuos de madera de tres especies distintas, cuya disponibilidad es abundante en el país.

Por otra parte, se puede observar en la Fig. 4.10, que los procedimientos de lavado por inmersión y en recirculación sin cavitación hidrodinámica dieron lugar a resultados similares; las diferencias entre ellos pueden ser consideradas dentro de la incerteza del método de medición. En ambos casos, se cuadruplica el rendimiento de glucosa respecto al obtenido para la biomasa cruda. Teniendo en cuenta estos resultados, que indican un efecto despreciable de recircular el agua de lavado a través del sólido en lugar de dejarlo en inmersión con agitación del agua mediante una bomba de pecera, para los posteriores ensayos se decidió realizar solamente los lavados por inmersión como referencia para evaluar la eficiencia de intensificar la etapa de lavado por HC. Dado que se alcanzan rendimientos y velocidades iniciales similares, se elige el método por inmersión debido al menor requerimiento energético que implica y su menor complejidad operativa.

4.2.2.2 Maderas de distintas especies

La **Figura 4.11** muestra comparativamente los resultados de la sacarificación de *Eucalyptus sp.*, *Tipuana tipu* y *Pinus sp.*, tanto crudos como delignificados con HPAC. Cabe destacar que, a diferencia de las hojas de *Platanus acerifolia*, estos tres sustratos presentan un contenido muy bajo y hasta despreciable de lignina luego de la etapa de hidrólisis ácida-oxidativa. Como en el caso anterior, los rendimientos se calculan en base a la masa seca inicial, *i.e.*, considerando que el sólido contiene solamente celulosa, incluso para el caso del crudo.

Los RLC de madera utilizados fueron sometidos a los distintos procedimientos de lavado descritos anteriormente luego de la etapa de hidrólisis ácida-oxidativa. En estos casos, se emplearon muestras de aserrín con una distribución de tamaños de entre 590 y 3350 μm , que fueron lavadas por inmersión, y por recirculación intensificada con HC (sin circulación de sólido). La intensificación por HC siempre contó con un remanente de H_2O_2 proveniente de la etapa de

pretratamiento, al quedar esta adsorbida u ocluida en el sólido. Dado que no se observó efecto alguno de la concentración de peróxido de hidrógeno en el tratamiento por HC del papel de filtro sobre su posterior sacarificación, se decidió no cuantificar sistemáticamente esta concentración en el agua de lavado de los RLC.

La **Tabla 4.4** resume los rendimientos luego de 28 h y las velocidades iniciales para cada sustrato. Las muestras crudas de *Tipuana tipu* y *Pinus sp.* dieron rendimientos muy bajos de glucosa, llegando sólo al 1% luego de 6 h, sin posterior incremento al cabo de 28 h. Por su parte, el *Eucalyptus sp.* presenta una velocidad inicial tres veces mayor, alcanzando un rendimiento de 3% luego de 6 h que continuó aumentando hasta un 8% al cabo de 28 h. A pesar de que el rendimiento con *Eucalyptus sp.* es mejor que el obtenido para las hojas de *Platanus acerifolia*, sigue siendo demasiado bajo para un uso industrial eficiente, remarcando la importancia de emplear un pretratamiento químico previo a la hidrólisis enzimática. Como referencia se sometió a la muestra de *Eucalyptus sp.* sin pretratamiento a un procedimiento de lavado intensificado por cavitación hidrodinámica, encontrándose una influencia despreciable sobre los resultados de la sacarificación. En consecuencia, el efecto de la cavitación es significativo principalmente cuando se intensifica el lavado de las muestras pretratadas con HPAC.

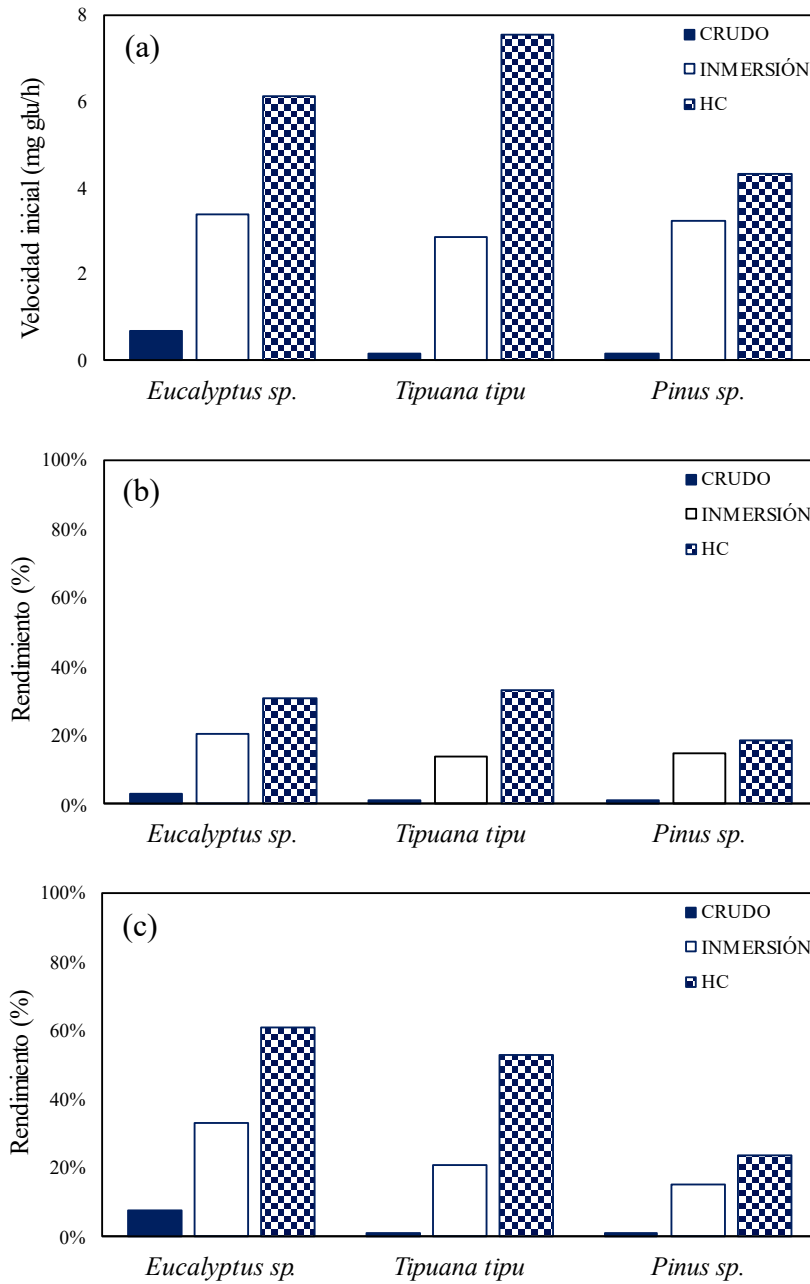


Figura 4.11. Comparación del efecto del procedimiento de lavado sobre la sacarificación de madera de *Eucalyptus sp.*, *Tipuana tipu* y *Pinus sp.*. (a) Velocidad inicial. (b) Rendimiento de glucosa luego de 6 h. (c) Rendimiento de glucosa luego de 28 h.

Tabla 4.4. Rendimiento de glucosa luego de 28 h y velocidad inicial de la sacarificación de RLC de madera, empleando diferentes procedimientos de lavados.

Procedimiento de lavado	Rendimiento* de glucosa luego de 28 h		Velocidad inicial de formación de glucosa (mg/h)	
	Inmersión	HC	Inmersión	HC
<i>Eucalyptus sp.</i>	33%	61%	3,4	6,1
<i>Tipuana tipu</i>	21%	53%	2,9	7,5
<i>Pinus sp.</i>	15%	24%	3,2	4,3

*considerando que el RLC delignificado sólo contiene celulosa

La delignificación con HPAC de las muestras crudas condujo a un aumento significativo de los rendimientos y velocidades iniciales de reacción, destacando la relevancia de eliminar la lignina de la matriz lignocelulósica para aumentar la eficiencia de la sacarificación enzimática. Además, aquellos sustratos en los que la etapa de lavado se intensificó con cavitación hidrodinámica produjeron rendimientos de glucosa y velocidades iniciales de reacción significativamente superiores a los obtenidos con los RLC pretratados lavados por inmersión.

El mayor rendimiento de glucosa al cabo de 28 h se obtuvo con *Eucalyptus sp.*, aumentando el rendimiento más de siete veces en comparación con el obtenido con la biomasa cruda. Las muestras cuyo lavado fue intensificado por HC alcanzaron un rendimiento de glucosa del 61%, casi el doble de los valores obtenidos con los procedimientos de lavado tradicionales. El efecto de la HC fue aún más notable para *Tipuana tipu*, que alcanzó sólo un 1% de rendimiento de glucosa para la muestra cruda y subió al 53% cuando la muestra fue delignificada y lavada incorporando cavitación hidrodinámica en el proceso. Con los métodos estándar de lavado, el rendimiento fue menos de la mitad, alrededor del 20%. El efecto fue particularmente alto en el periodo inicial de la hidrólisis enzimática. Las muestras de *Pinus sp.* delignificadas mostraron el peor desempeño, con una mejora casi marginal al intensificar la etapa de lavado por HC. Los resultados obtenidos con *Pinus sp.* fueron comparables a los de las hojas de *Platanus acerifolia*.

Los mayores rendimientos obtenidos con los RLC delignificados cuando la etapa de lavado se intensifica con HC pueden atribuirse a la ruptura de las fibras de celulosa y la eliminación de

compuestos inhibitorios que podrían haber permanecido de la matriz lignocelulósica original o haberse formado durante la hidrólisis oxidativa-ácida. El colapso de las burbujas de cavitación induce ondas de choque y genera radicales hidroxilos capaces de eliminar compuestos orgánicos que pueden inhibir a la enzima. También puede modificar la morfología de las muestras, aumentando la accesibilidad de la superficie. Cuando la lignina no se elimina completamente con HPAC, si bien se observan mejoras inducidas por HC durante el periodo inicial, el rendimiento final es bajo, probablemente debido a la inhibición enzimática por los compuestos orgánicos remanentes en el sólido. Por otro lado, se presume que la cristalinidad de la celulosa puede reducir su biodisponibilidad, resultando un impedimento para la actividad de las celulasas. El índice de cristalinidad, al igual que para los sustratos sin pretratamiento, se determinó a partir de los espectros de difracción de rayos X que se presentan en las **Figuras 4.12 a 4.15**. Los resultados para los distintos RLC lavados con y sin intensificación por HC se muestran en la **Tabla 4.5**.

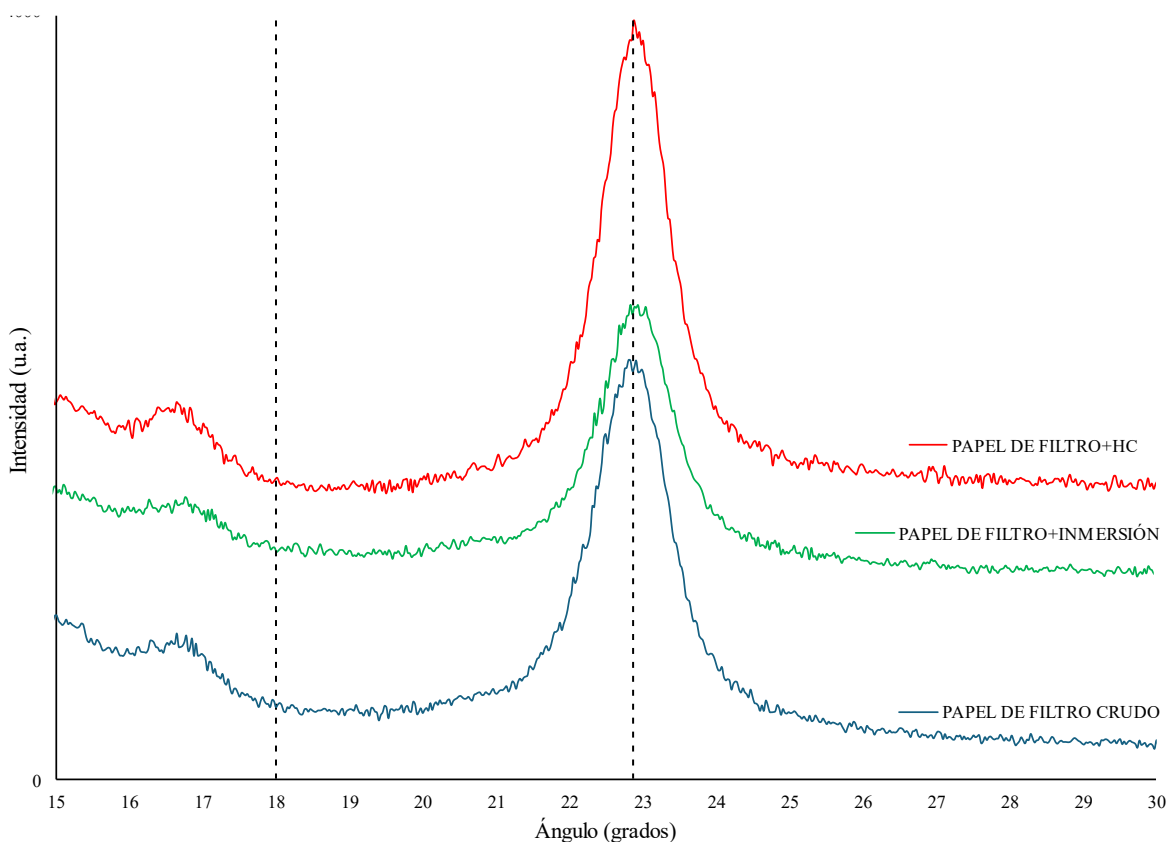


Figura 4.12. Espectros obtenidos por DRX de las muestras de papel de filtro crudo (sin pretratamiento) y lavado por inmersión o en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica. Las líneas punteadas indican el ángulo del pico cristalino y del valle amorfo para calcular el índice según el método de Segal et al. (1959).

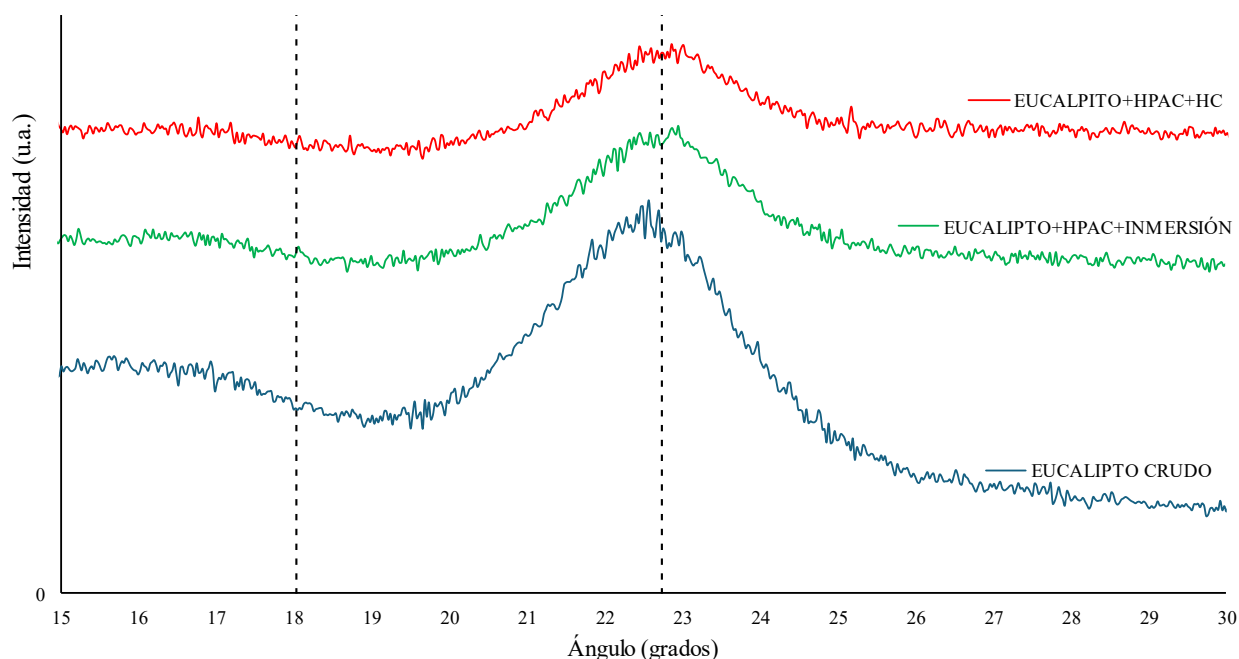


Figura 4.13. Espectros obtenidos por DRX de las muestras de *Eucalyptus sp.*, cruda (sin pretratamiento) y delignificadas con HPAC y lavadas por inmersión o en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica. Las líneas punteadas indican el ángulo del pico cristalino y del valle amorfo para calcular el índice según el método de Segal et al. (1959).

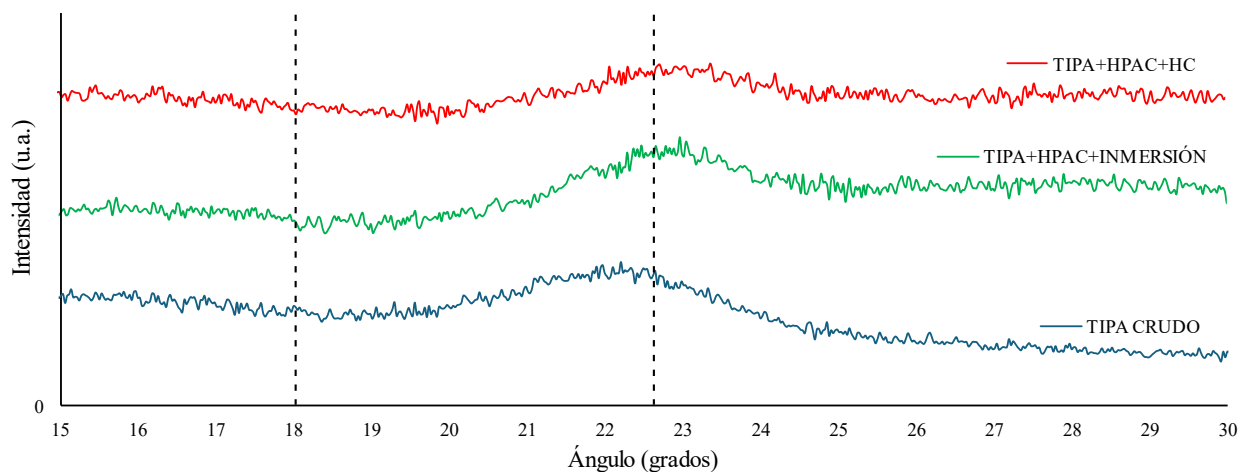


Figura 4.14. Espectros obtenidos por DRX de las muestras de *Tipuana tipu*, cruda (sin pretratamiento) y delignificadas con HPAC y lavadas por inmersión o en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica. Las líneas punteadas indican el ángulo del pico cristalino y del valle amorfo para calcular el índice según el método de Segal et al. (1959).

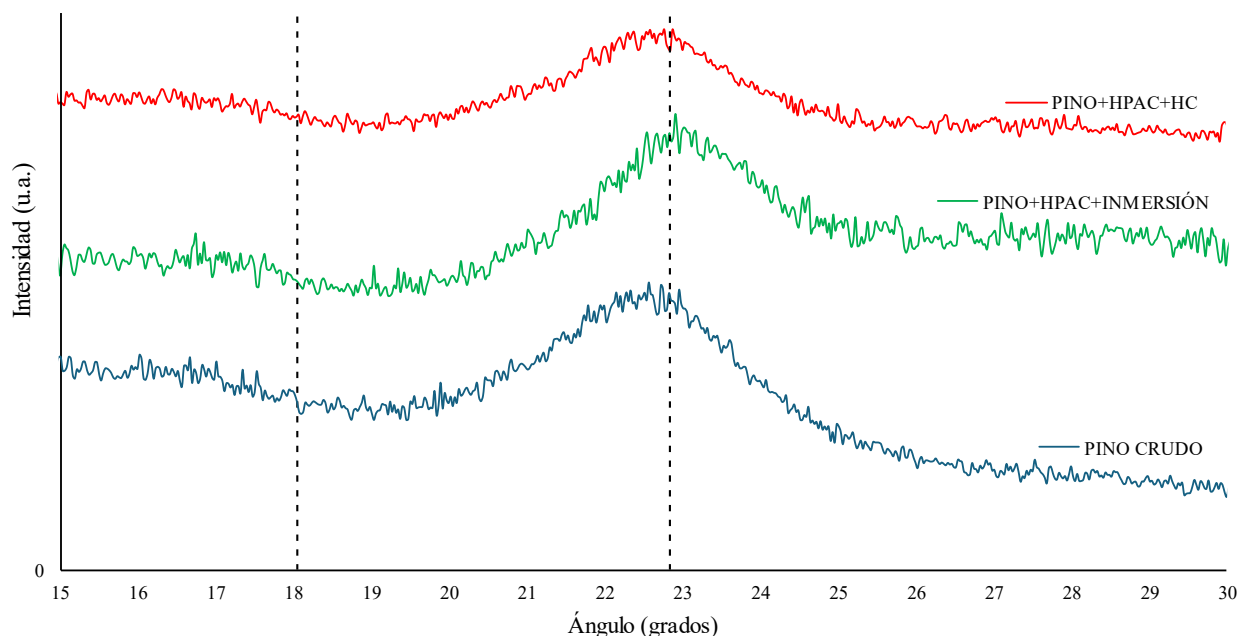


Figura 4.15. Espectros obtenidos por DRX de las muestras de *Pinus sp.*, cruda (sin pretratamiento) y delignificadas con HPAC y lavadas por inmersión o en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica. Las líneas punteadas indican el ángulo del pico cristalino y del valle amorfo para calcular el índice según el método de Segal et al. (1959).

Cuando se utiliza HC durante el proceso de lavado, el índice de cristalinidad es más bajo que el obtenido con un lavado tradicional, por lo que podría haber un efecto de aumento en la cantidad de celulosa amorfa disponible para la hidrólisis. Sin embargo, dado que los incrementos encontrados son grandes, el efecto también podría estar relacionado con otros factores, como la eliminación de compuestos tóxicos y modificaciones de la morfología. Además, el índice de cristalinidad del papel de filtro ronda el 80% para todos los casos, siendo más alto que el de los RLC delignificados. Comparativamente, a pesar de la estructura cristalina de la celulosa del papel de filtro utilizado, se obtienen altos rendimientos de glucosa, lo que indica una buena biodisponibilidad de celulosa para las enzimas de la mezcla Cellic CTec3 para promover la formación de glucosa independientemente de la cristalinidad. Esto sugiere que es factible que haya influencia de otros factores en el caso de los RLC.

Tabla 4.5. Índice de cristalinidad de los distintos sustratos sólidos estudiados, teniendo en cuenta el procedimiento de lavado al que fueron sometidos.

Procedimiento de lavado	Índice de cristalinidad (%)			
	Crudo (sin delignificar y sin lavar)	Inmersión	HC	HC con H ₂ O ₂
<i>Papel de filtro</i>	82,4	79,8	84,2	81,8
<i>Eucalyptus sp.</i>	53,2	56,6	-	51,2
<i>Tipuana tipu</i>	30,8	44,0	-	35,0
<i>Pinus sp.</i>	38,3	46,2	-	38,9

Con el fin de analizar la influencia de la estructura y textura de la matriz de los RLC, las muestras crudas y las delignificadas y lavadas se observaron por microscopía de barrido electrónico (SEM). Las **Figuras 4.16 a 4.18** muestran las imágenes obtenidas por microscopía SEM de los distintos RLC. Se puede observar que para todos los sustratos crudos las fibras están agrupadas y poco accesibles para la efectiva adsorción de la enzima. Por el contrario, para los sustratos que fueron tratados con HPAC se observa cierta separación entre las fibras de celulosa y una estructura más abierta y rugosa. Sin embargo, el efecto depende de la especie. Para las muestras de *Eucalyptus sp.* y *Tipuana tipu* se puede ver que aquellas cuya etapa de lavado fue intensificada por cavitación presentan una superficie más rugosa que las lavadas por inmersión. En particular, en el caso de *Tipuana tipu* se observan fibras más disgregadas y dispuestas en una estructura más desordenada. En contraposición, para el *Pinus sp.* no se observan diferencias significativas entre las muestras que fueron lavadas por inmersión y las que fueron cavitadas durante la etapa de lavado. Además, a diferencia de los otros RLC, la estructura de las muestras de *Pinus sp.* delignificadas no presentan diferencias sustanciales en comparación a las muestras sin pretratamiento.

Continuando con el análisis de la estructura y de posibles residuos de lignina que hubieran quedado, se observaron por microscopía óptica las muestras de los RLC sin y con pretratamiento. Estas muestras fueron inicialmente sometidas a tinción con un reactivo específico que permite visualizar la presencia de restos de lignina. La **Figura 4.19** presenta microscopías representativas, a partir de las cuales se evidencia que hubo una efectiva remoción de la lignina en los sustratos tratados con HPAC. Notar particularmente que en el caso de los crudos (sin pretratamiento) la

tinción desarrolla un color bordó-violáceo que indica lignina, el cual desaparece completamente en las muestras delignificadas por HPAC. Las fibras de las muestras de *Eucalyptus sp.* y de *Tipuana tipu* tratadas con HPAC, para ambos procedimientos de lavado, se observan disgregadas, adelgazadas y desordenadas, sugiriendo una buena accesibilidad para la enzima. Las muestras de *Eucalyptus sp.* tratado con HPAC presentan las fibras más abiertas, sugiriendo una mayor disponibilidad de la celulosa para la reacción enzimática y efectivamente son las muestras que condujeron al mayor rendimiento de glucosa. Por el contrario, las muestras delignificadas de *Pinus sp.* conservan una estructura de fibras más densa y entrelazada. A su vez, en las muestras delignificadas de *Pinus sp.* se pueden observar burbujas de aire atrapadas dentro de las traqueidas (ver flechas blancas en la Fig. 4.19 c). Esto es particularmente evidente en la muestra sometida a hidrólisis ácida-oxidativa seguida del lavado en recirculación intensificado por HC, lo que remarca la estabilidad de la estructura de esta especie. Este resultado no sólo indica que las muestras de *Pinus sp.* mantienen su estructura densa original poco accesible luego de la delignificación, sino que también evidencia que la estructura del xilema de esta gimnosperma presenta una dificultad particular para que el líquido acceda dentro de los conductos, dado que hay aire ocluido en los mismos. Esta puede ser una razón por la cual las muestras de *Pinus sp.* condujeron a rendimientos de glucosa en la sacarificación mucho menores que los otros RLC, debido a este impedimento para la enzima de acceder a las fibras de celulosa que forman las paredes de los conductos donde hay aire.

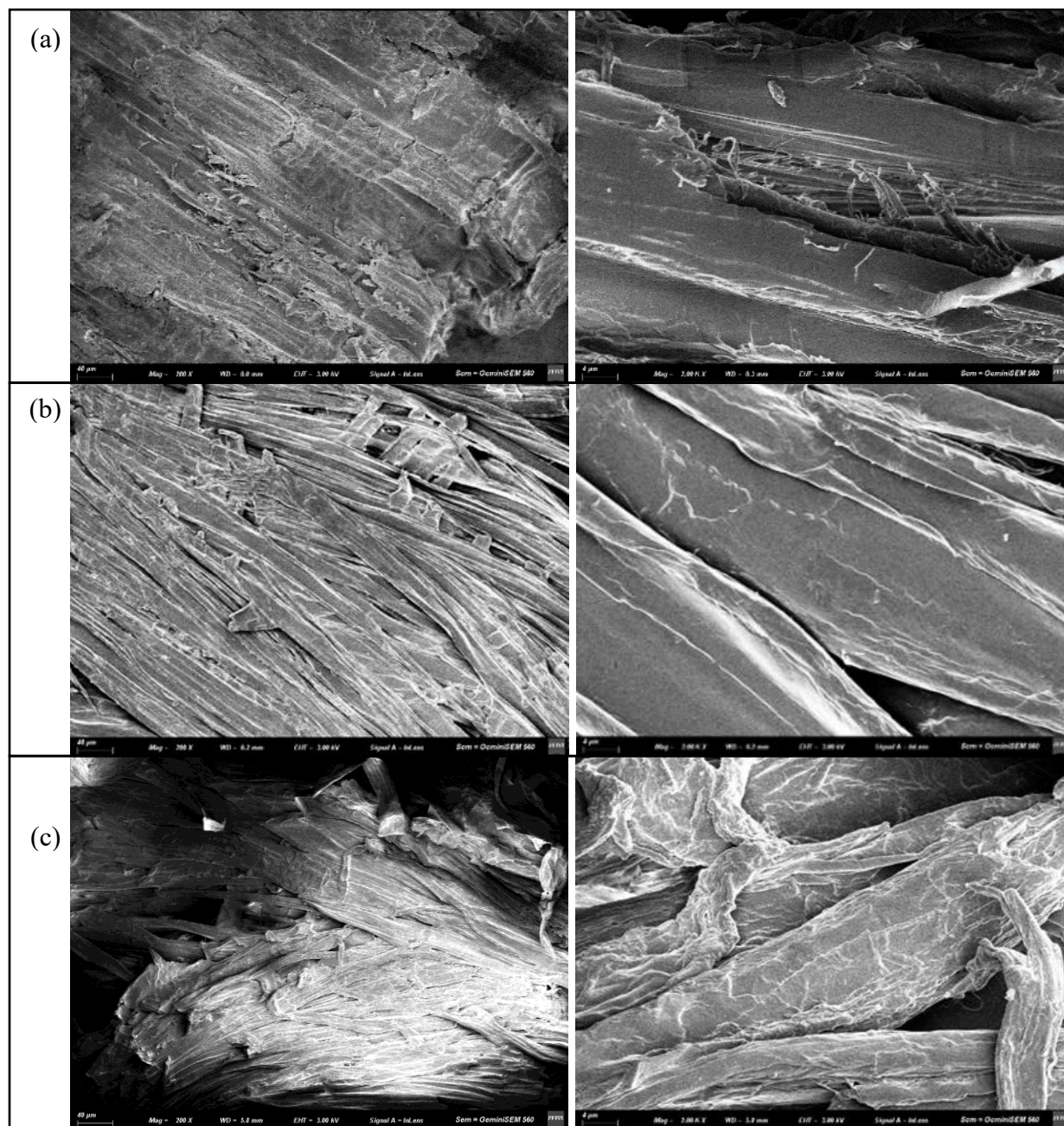


Figura 4.16. Microscopia de barrido electrónico (SEM) de *Eucalyptus* sp. sometido a diferentes tratamientos: (a) crudo (sin pretratamiento), (b) delignificado con HPAC y lavado por inmersión, (c) delignificado con HPAC y lavado en recirculación con intensificación por cavitación hidrodinámica. Magnificación aproximada: x200 (izquierda), x2000 (derecha).

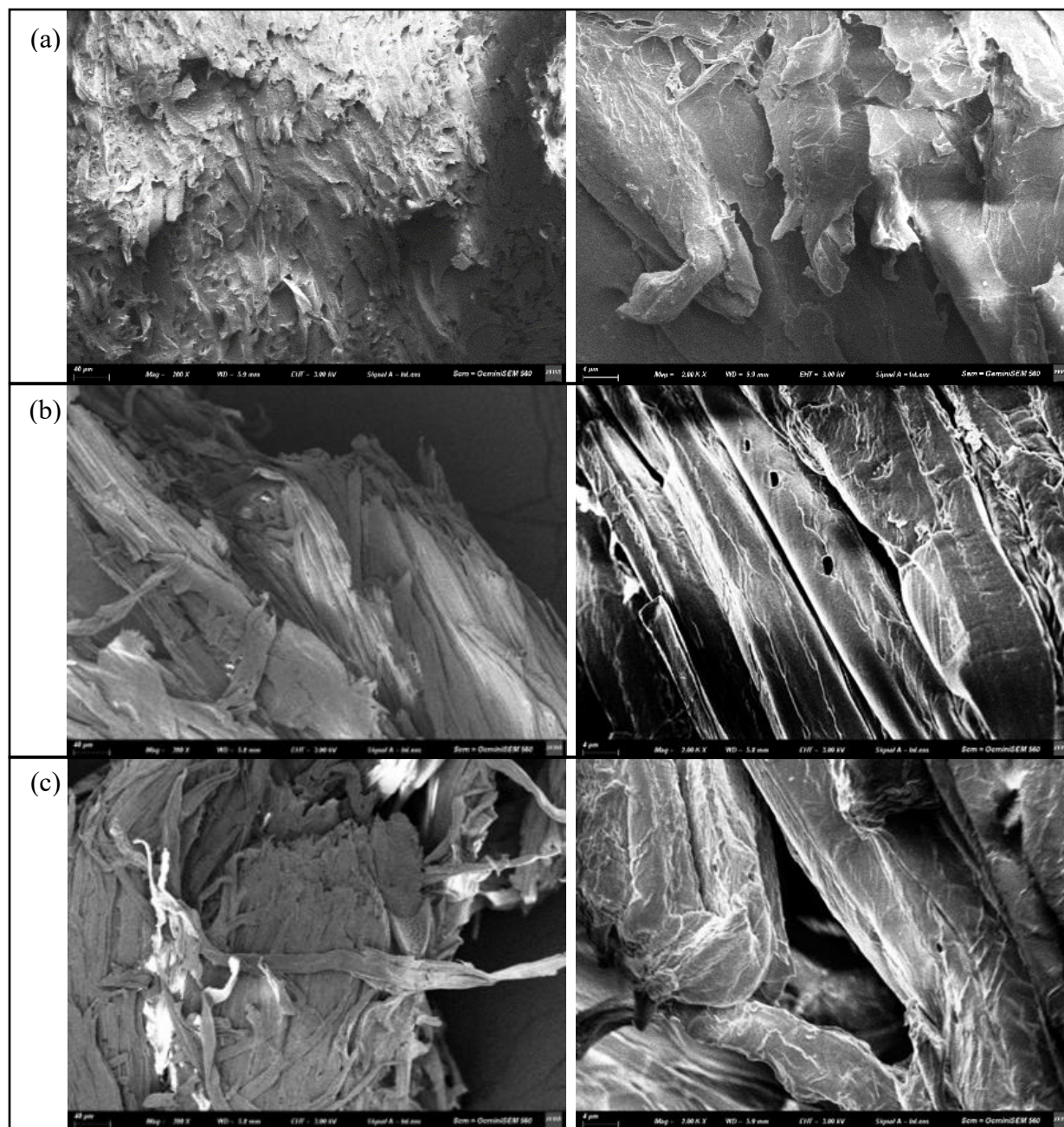


Figura 4.17. Microscopia de barrido electrónico (SEM) de *Tipuana tipu* sometido a diferentes tratamientos: (a) crudo (sin pretratamiento), (b) delignificado con HPAC y lavado por inmersión, (c) delignificado con HPAC y lavado en recirculación con intensificación por cavitación hidrodinámica. Magnificación aproximada: x200 (izquierda), x2000 (derecha).

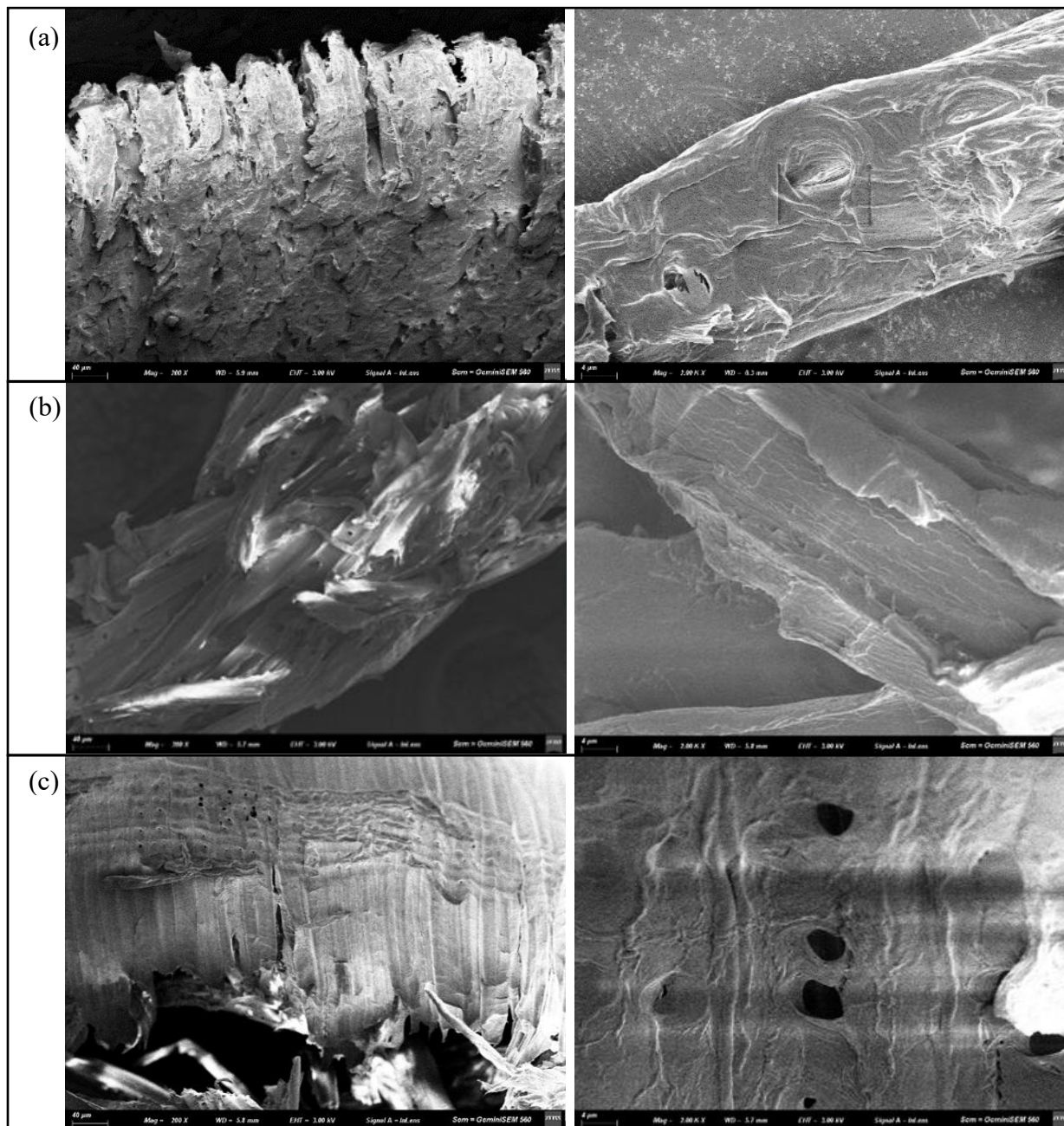


Figura 4.18. Microscopia de barrido electrónico (SEM) de *Pinus sp.* sometido a diferentes tratamientos: (a) crudo (sin pretratamiento), (b) delignificado con HPAC y lavado por inmersión, (c) delignificado con HPAC y lavado en recirculación con intensificación por cavitación hidrodinámica. Magnificación aproximada: x200 (izquierda), x2000 (derecha).

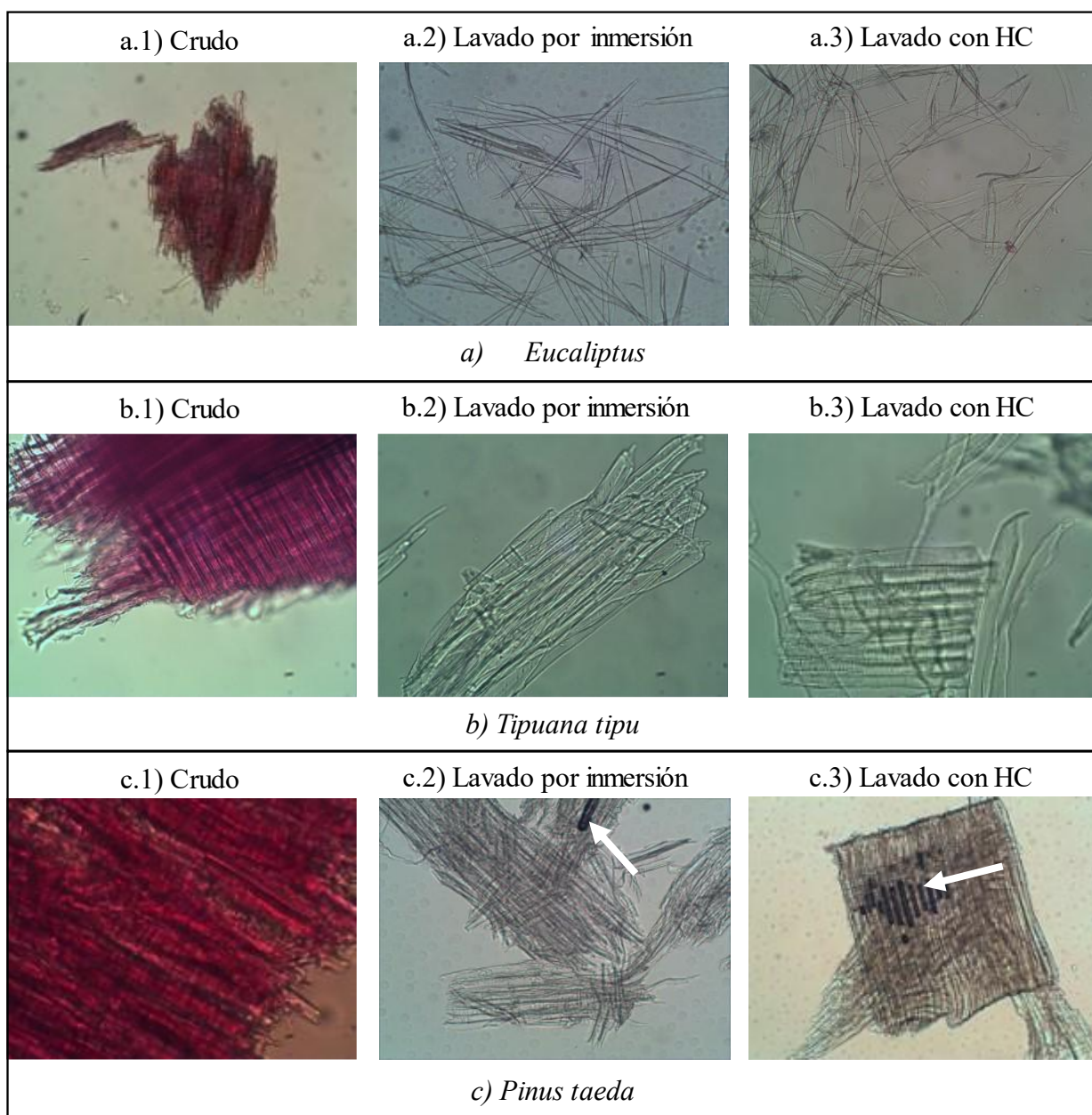


Figura 4.19. Microscopía óptica de tinción de los distintos RLC sometidos a diferentes tratamientos. a) *Eucalyptus sp.*: a.1) crudo (sin pretratamiento), a.2) delignificado con HPAC y lavado por inmersión, a.3) delignificado con HPAC y lavado en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica. b) *Tipuana tipu*: b.1) crudo (sin pretratamiento), b.2) delignificado con HPAC y lavado por inmersión, b.3) delignificado con HPAC y lavado en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica. c) *Pinus sp.*: c.1) crudo (sin pretratamiento), c.2) delignificado con HPAC y lavado por inmersión, c.3) delignificado con HPAC y lavado en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica. La flecha blanca indica la presencia de aire ocluido.

Las **Figuras 4.20 a 4.22** ilustran los espectros obtenidos por FTIR de los RLC crudos y pretratados por HPAC y posteriormente lavados, en el rango de 650 a 1800 cm^{-1} . No se incluye el rango de 1800 a 4000 cm^{-1} porque no aparecen en ese rango señales diferenciadas, solo un pico amplio alrededor de 3300 cm^{-1} relacionado con las vibraciones de las uniones O-H y C-H presentes en los tres componentes y que aparece similar en todas las muestras. En las figuras, se remarca la zona que se ha considerado para estimar el contenido de lignina, siguiendo la sugerencia de Kostryukov et al. (2023), quienes tomaron la señal alrededor de 1512 cm^{-1} (integración entre 1490 y 1530 cm^{-1}) correspondiente a la vibración del esqueleto aromático, presente únicamente en la lignina. La integración del *Eucalyptus sp.* crudo se asimila al valor que se ha determinado según la norma TAPPI y los demás espectros se refieren a este valor. Estrictamente, es conveniente incluir un estándar interno (en general, se utiliza tiocianato de plomo), pero en nuestro caso no disponíamos del compuesto y también resultaba más engorroso preparar la pastilla para realizar la medición. En consecuencia, consideramos como referencia la altura del pico que aparece alrededor de 1050-1060 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de estiramiento simétricas de los enlaces C-O y simétricas y asimétricas de los enlaces C-O-C. Si bien esta metodología introduce un error, nos permitió realizar una estimación aproximada del contenido de lignina en los RLC delignificados y lavados utilizando muy poca muestra. Los resultados del contenido de lignina calculados siguiendo este procedimiento se enumeran en la **Tabla 4.6**.

En concordancia con lo observado en Figura 4.19, los resultados de la espectroscopía FTIR presentados en la **Tabla 4.6**, indican que las limitaciones observadas en la sacarificación de *Pinus sp.* no están asociadas a la presencia de lignina en las muestras. Incluso, los pequeños remanentes que pudieran contener las muestras de *Eucalyptus sp.* y *Tipuana tipu* pretratadas tienen menor influencia que la estructura sobre la sacarificación.

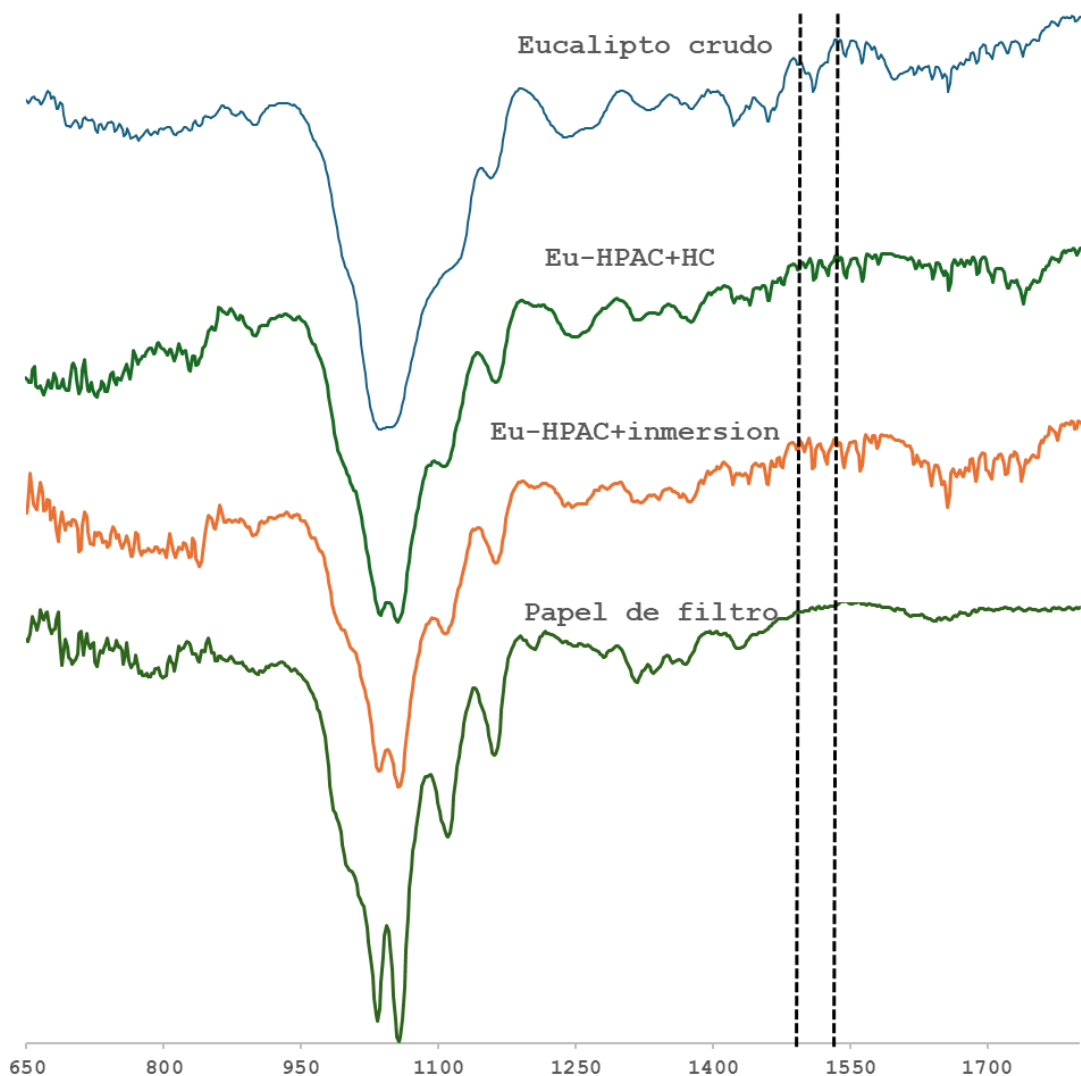


Figura 4.20. Espectros obtenidos por FTIR de las muestras de *Eucalyptus sp.*, cruda (sin pretratamiento) y delignificadas con HPAC y lavadas por inmersión o en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica. Se incluye también la muestra de papel de filtro para referencia comparativa. Las líneas punteadas delimitan el rango considerado en la integración para estimar el contenido de lignina.

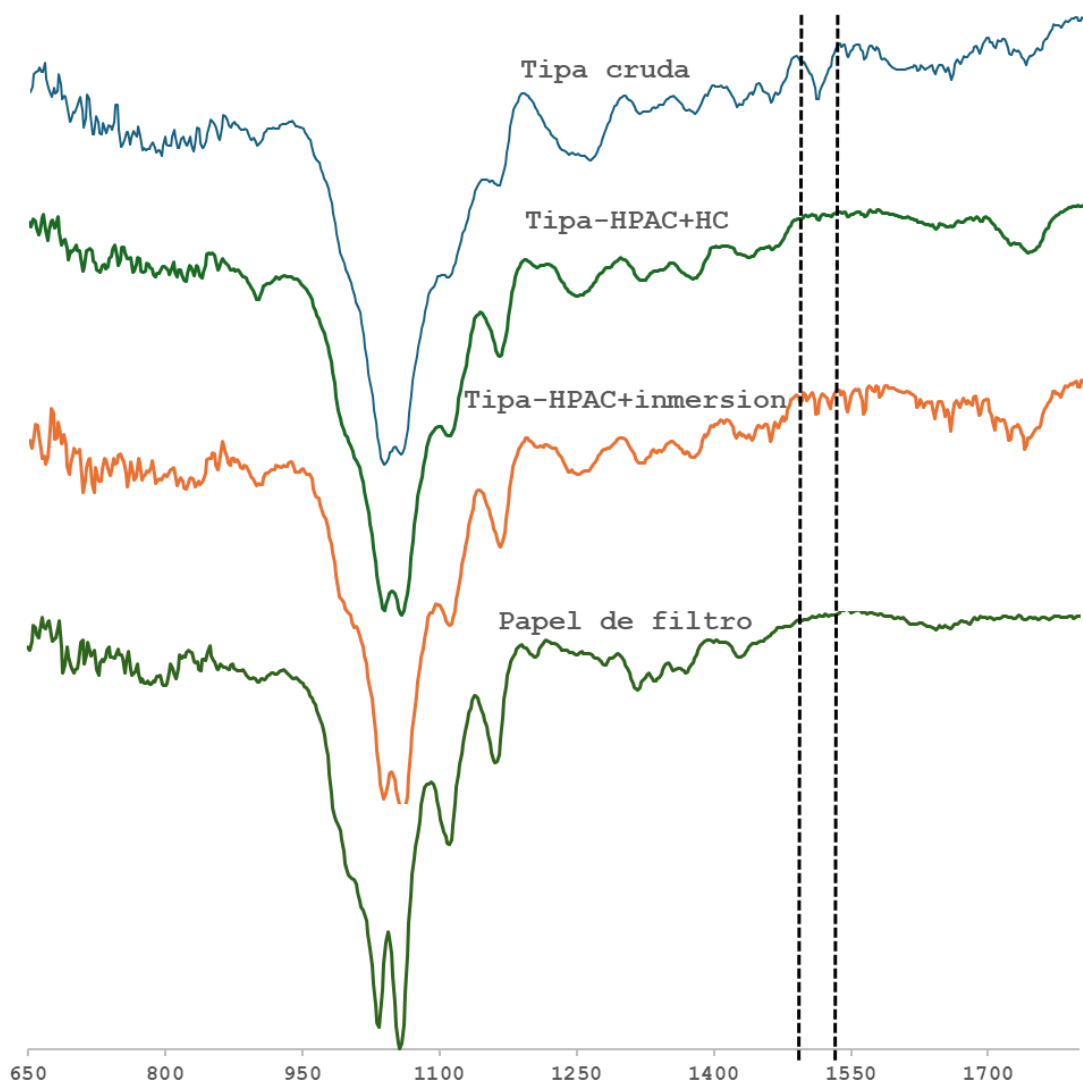


Figura 4.21. Espectros obtenidos por FTIR de las muestras de *Tipuana tipu*, cruda (sin pretratamiento) y delignificadas con HPAC y lavadas por inmersión o en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica. Se incluye también la muestra de papel de filtro para referencia comparativa. Las líneas punteadas delimitan el rango considerado en la integración para estimar el contenido de lignina.

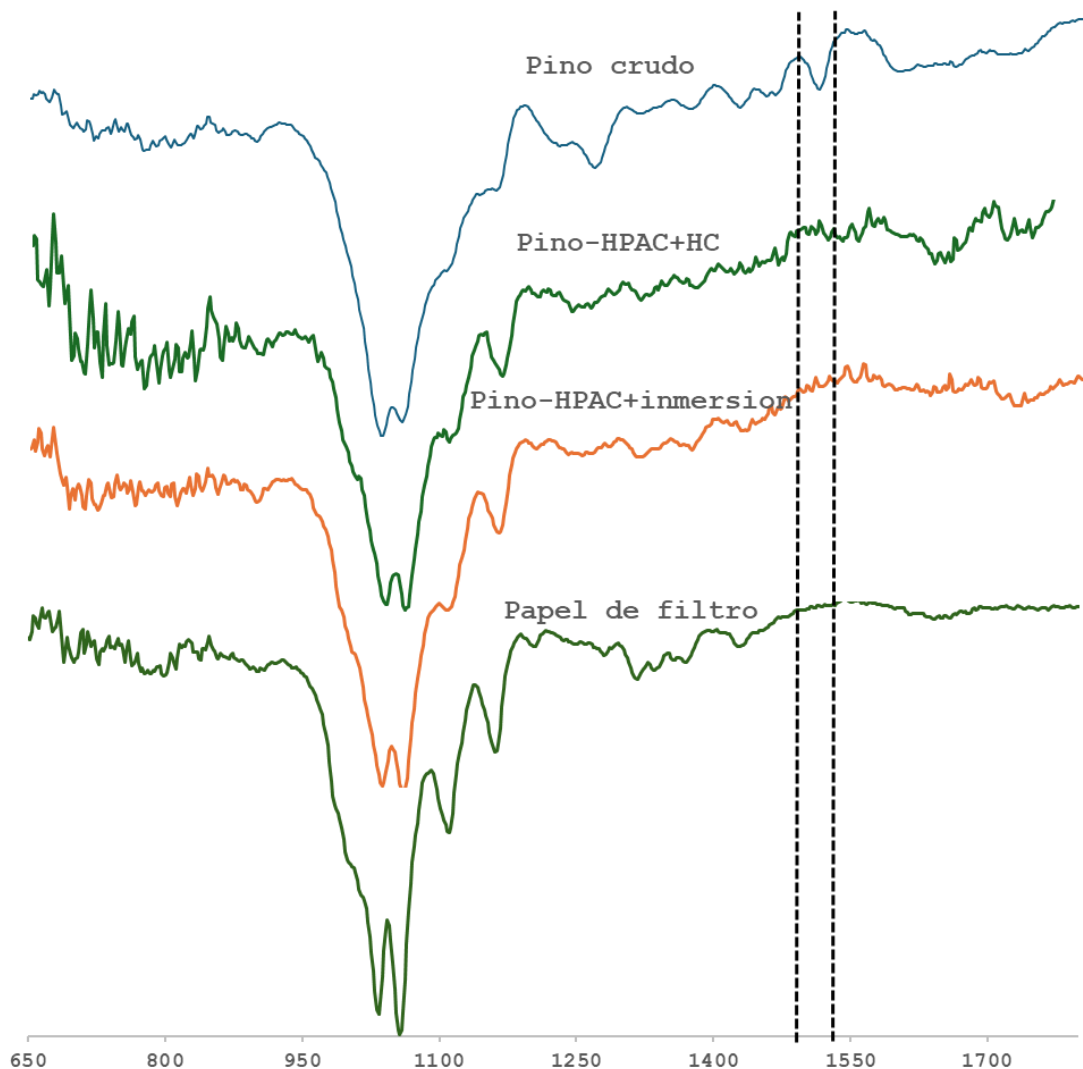


Figura 4.22. Espectros obtenidos por FTIR de las muestras de *Pinus sp.*, cruda (sin pretratamiento) y delignificadas con HPAC y lavadas por inmersión o en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica. Se incluye también la muestra de papel de filtro para referencia comparativa. Las líneas punteadas delimitan el rango considerado en la integración para estimar el contenido de lignina.

Tabla 4.6. Contenido de lignina de los distintos RLC estudiados, teniendo en cuenta el procedimiento de lavado al que fueron sometidos, estimada a partir de la norma TAPPI o de espectroscopía FTIR.

Procedimiento de lavado	Contenido de lignina (%)		
	Crudo (sin delignificar y sin lavar)	Inmersión	HC
<i>Eucalyptus sp.</i>	24*	3,3**	2,7**
<i>Tipuana tipu</i> **	29	3,1	0
<i>Pinus sp.</i> **	34	0	0

* determinadas por norma TAPI T222

** determinada a partir de FTIR considerando los resultados de *Eucalyptus sp.* crudo.

4.3 Sacarificación de los sustratos sometidos a un procedimiento de lavado intensificado por cavitación hidrodinámica, con circulación de sólido

La cavitación hidrodinámica ocasiona alteraciones de las superficies sólidas que se encuentran próximas a la zona donde ocurre la implosión de la burbuja, como se describió en el Capítulo 1. Estas modificaciones son generalmente mayores si el sólido es forzado a pasar a través del dispositivo de cavitación. La circulación del sólido a través del dispositivo de cavitación fue utilizada por Naragajan y Ranade (2019) para mejorar la producción de bio-gas. Estos autores encontraron mejoras significativas resultantes de forzar el sólido a través del dispositivo de cavitación, si bien el cavitador que utilizaron fue del tipo vórtex, no Venturi como en el caso de esta tesis. En consecuencia, resulta importante analizar la influencia de hacer circular el sólido a través del tubo Venturi, como método de intensificación del proceso de lavado, y analizar su influencia sobre la posterior etapa de sacarificación. Además, teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los distintos sustratos, que sugieren que la actividad enzimática se ve favorecida ante los cambios en la morfología del sólido, se decidió estudiar el efecto que pudiera tener hacer circular el sólido a través del dispositivo de cavitación (Venturi) durante su etapa de lavado. En

este caso se utilizó solamente *Eucalyptus sp.* debido a los buenos rendimientos observados anteriormente con esta especie.

Las suspensiones sólidas no pueden circular a través de bombas centrífugas comunes sin destruirlas, por lo cual, para estas experiencias, se utilizó una bomba tornillo de desplazamiento positivo, como se describió en el Capítulo 2. A fin de proteger el funcionamiento de la bomba tornillo que impulsa la suspensión y de evitar taponamientos del tubo Venturi, se decidió emplear polvo con una distribución de tamaños entre 297 y 590 μm . Para ser estrictos en la comparación, se utilizó el mismo sólido en la disposición sin circulación, formando un lecho fijo ubicado a la salida del cavitador. La **Figura 4.23** muestra comparativamente los resultados obtenidos en la sacarificación del polvo de *Eucalyptus sp.* pretratado con HPAC y lavado posteriormente en recirculación, intensificando la etapa por HC con y sin circulación del sólido. Como referencia, se incluye también los resultados de la sacarificación del polvo de *Eucalyptus sp.* delignificado y lavado por inmersión. Se observa que, como ocurrió con las muestras de *Eucalyptus sp.* de mayor granulometría, la cavitación hidrodinámica mejora tanto los rendimientos como la velocidad inicial de reacción. Sin embargo, al comparar los dos métodos de lavado intensificados con HC, se evidencia que la circulación del sólido a través del dispositivo de cavitación no tiene un efecto significativo sobre la sacarificación del sólido resultante, y las diferencias sólo se observan durante las primeras horas de reacción. La velocidad inicial de formación de glucosa aumenta de 12,7 a 12,9 mg/h, mientras que el rendimiento pasa de 48 a 52% cuando el sólido circula a través del Venturi. Luego de 28 h de reacción, alcanzan ambos un 64% de conversión. En consecuencia, no hay clara evidencia de que la circulación del sólido a través del cavitador tipo Venturi tenga efectos positivos sobre la posterior hidrólisis enzimática. Cabe remarcar que el rendimiento obtenido con el polvo de *Eucalyptus sp.* es similar al obtenido con muestras de mayor granulometría, resultado que indica que no sería necesaria una molienda tan intensa para utilizar este RLC en forma industrial con el objetivo de generar el sustrato base de carbono de una fermentación. También podría ser conveniente incorporar el sólido remanente de la sacarificación, dado que este sólido prácticamente no contiene lignina y eventualmente podría ser consumido por los microorganismos en crecimiento, o funcionar como soporte de agregados de células en el caso de formación de biofilms.

Por otra parte, la circulación del sólido a través del dispositivo condujo a generar un sólido mucho más disgregado, semejante a una pulpa, difícil de filtrar y manipular. Además, luego del filtrado mostró una significativa tendencia a aglomerarse fuertemente, complicando la etapa posterior de sacarificación, ya que esta requiere la manipulación mecánica del sólido filtrado para que pueda efectivamente entrar en contacto con la enzima. Estas características no serían adecuadas, o al menos convenientes, para su manipulación industrial. En consecuencia, para el objetivo de generar un sustrato base de carbono por hidrólisis enzimática de RLC pretratados por HPAC, sería recomendable el uso de un lecho fijo ubicado a la salida del cavitador, lográndose el mismo rendimiento con menor necesidad de intervención, y requiriendo un montaje más sencillo, versátil y fácilmente escalable.

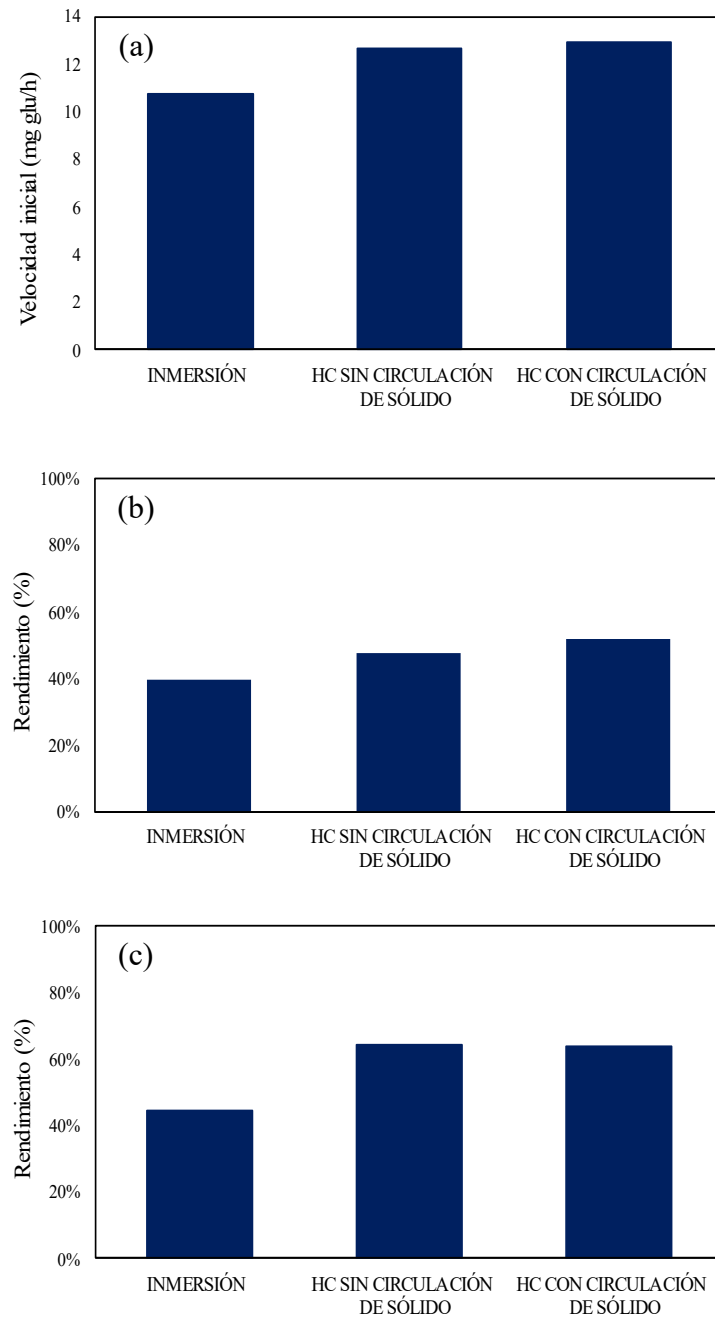


Figura 4.23. Comparación del efecto del método de lavado sobre la sacarificación de polvo de *Eucalyptus sp.* (a) Velocidad inicial. (b) Rendimiento de glucosa luego de 6 h. (c) Rendimiento de glucosa luego de 28 h.

4.4 Efecto del número de pasos a través del dispositivo de cavitación

4.4.1 Sacarificación de *Eucalyptus sp.*

El efecto de la cavitación hidrodinámica en general depende del “número de pasos” a través del dispositivo de cavitación. El número de pasos se refiere a la cantidad de veces que el líquido contenido en el tanque reservorio se hace circular a través del dispositivo, y se calcula teniendo en cuenta el volumen de líquido en el tanque y su velocidad de recirculación, como se describió en el Capítulo 1. Por lo tanto, la sacarificación del polvo delignificado de *Eucalyptus sp.* con menor diámetro de partícula se llevó a cabo tomando muestras a distintos tiempos, lo que equivale a diferentes números de pasos. La **Figura 4.24** ilustra la evolución temporal de la masa de glucosa generada y los rendimientos de glucosa después de 6 y 28 h de reacción, para el sólido pretratado y sometido a un lavado intensificado por HC, cuando el sólido se dispone en un recipiente a la salida del cavitador formando un lecho fijo. Se puede observar que la influencia del número de pasos en las primeras horas de sacarificación es baja, pero a partir de las 4 h de reacción se comienza a apreciar una diferencia significativa, que finalmente evoluciona hacia el resultado de rendimiento a las 28 h, donde se aprecia una diferencia progresiva que indica un cierto efecto. Se puede concluir que, a medida que aumenta el número de pasos, la producción de glucosa luego de 6 h fue en aumento hasta los 50 pasos. Cuando el número de pasos fue superior a 50, no se observaron ulteriores mejoras. Este resultado es significativo teniendo en cuenta que la cavitación involucra un consumo energético relativamente alto y, en consecuencia, resulta importante evaluar un compromiso económico entre la energía requerida y la mejora en la masa de glucosa que se puede generar. A partir de los resultados ilustrados en la Fig. 4.24 b y c, 50 pasos parecería ser un óptimo porque conduce a un rendimiento de glucosa que es cerca de un 50% mayor que con 10 o 30 pasos. De todas formas, para un uso industrial, resultará importante analizar la conveniencia económica considerando que el tiempo también es una variable a tener en cuenta, dado que generalmente se requiere una producción rápida y un mayor número de pasos involucra mayor tiempo de lavado y mayor consumo energético. Finalmente, cabe remarcar nuevamente que, para el mismo número de pasos, los resultados fueron comparables a los obtenidos con diámetros de partículas más grandes, lo que indica que el tamaño del sólido tuvo un efecto despreciable dentro del rango examinado, por lo cual no se requiere una molienda tan intensa.

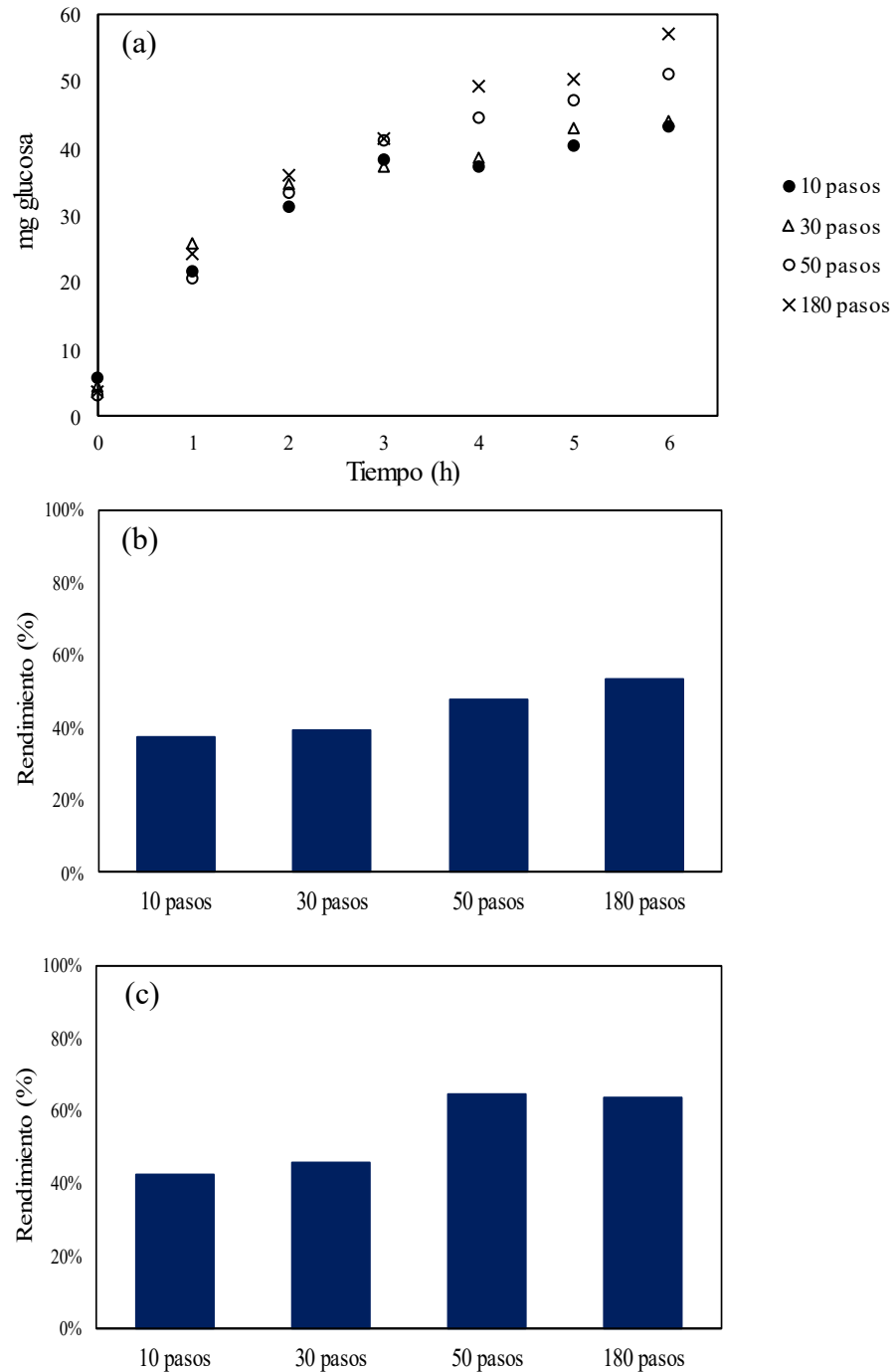


Figura 4.24. Efecto del número de pasos a través del dispositivo de cavitación sobre la sacarificación de polvo de *Eucalyptus sp.* cuando la etapa de lavado se intensifica por HC sin circulación de sólido. (a) Evolución temporal de la masa de glucosa generada durante las primeras 6 h. (b) Rendimiento luego de 6 h. (c) Rendimiento luego de 28 h.

Con el fin de analizar la influencia del número de pasos en el caso de circular el sólido a través del dispositivo de cavitación, se realizaron ensayos similares operando con el sistema que incluye la bomba tornillo de desplazamiento positivo. Como en el caso de utilizar un lecho fijo, se tomaron muestras a distintos números de pasos. La evolución temporal de la masa de glucosa generada y los rendimientos de glucosa a las 6 y 28 h se muestran en la **Figura 4.25**. El rendimiento de glucosa obtenido con recirculación de sólidos fue casi independiente del número de pasos, e incluso pareciera haber un ligero efecto negativo al aumentar el número de pasos. Además, los rendimientos obtenidos fueron menores a los obtenidos con el sólido dispuesto en forma de lecho fijo. Este resultado, aparentemente contradictorio con el que se ha presentado en la Figura 4.23, se debe a la dificultad en la manipulación del sólido cuando éste circula a través del dispositivo de cavitación. El sólido queda completamente disgregado y disperso, formando una pasta difícil de filtrar y manipular debido a la deformación que sufre al forzarlo a atravesar el dispositivo de cavitación tipo Venturi con alta velocidad, incluso después de sólo 10 pasos. El efecto negativo en comparación con mantener el sólido en un lecho fijo también podría estar relacionado con un cambio en las características reológicas del fluido circulante (al tratarse ahora de una suspensión) que disminuye la intensidad del colapso de las burbujas de cavitación. Otra posible causa de una menor eficiencia de la sacarificación podría estar relacionada con una oxidación parcial de algunos grupos oxhidrilos de la celulosa inducida por la cavitación al tener a las fibras más disgregadas, o a una competencia entre la disgregación del sólido y la remoción de compuestos tóxicos que disminuya su eficiente eliminación. Sin embargo, como estas diferencias no fueron observadas previamente en el experimento presentado en la Figura 4.23, consideramos que se deben fundamentalmente a la dificultad de manipulación del sólido, que a su vez remarca que no es un método conveniente para su uso industrial.

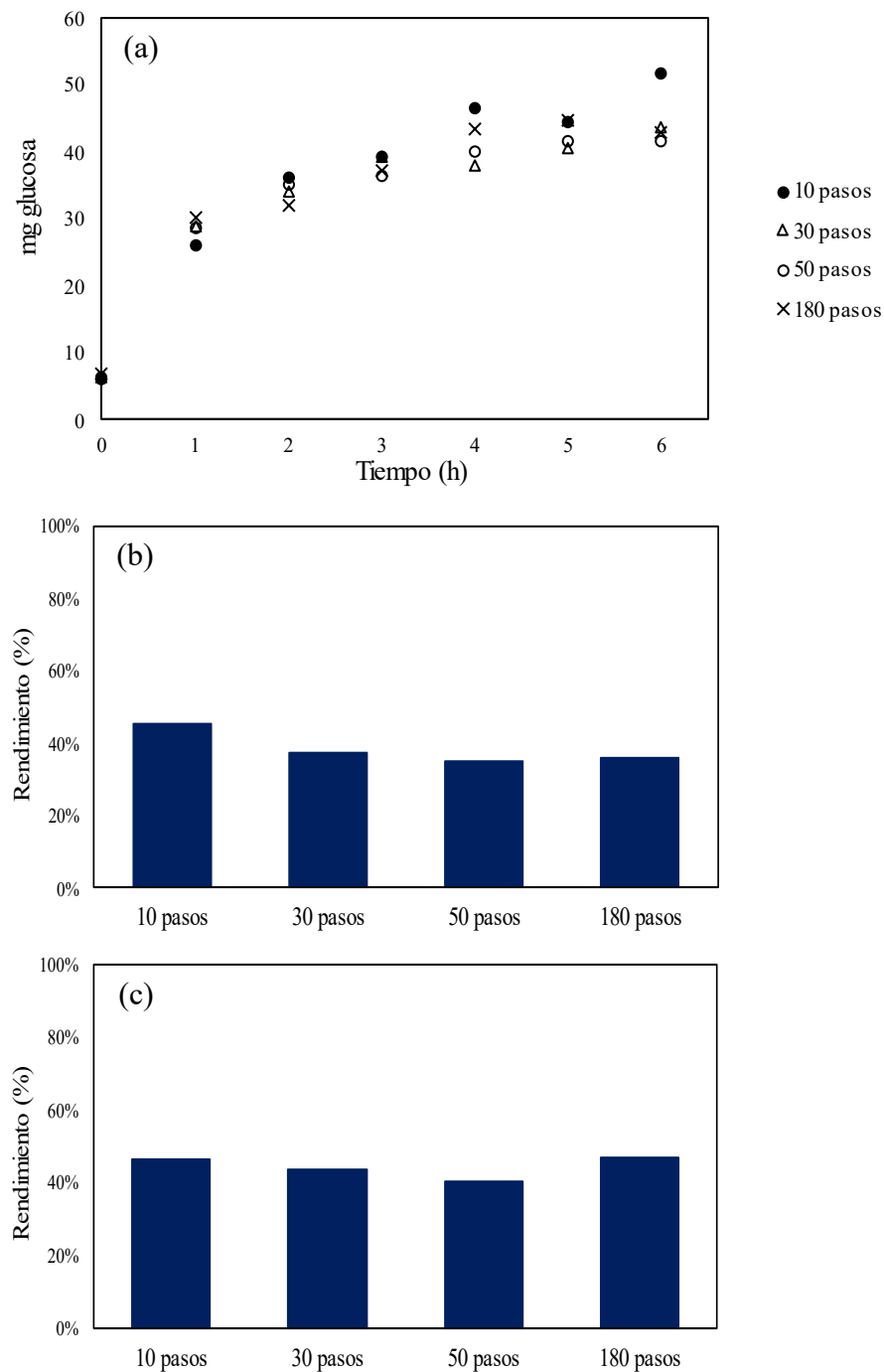


Figura 4.25. Efecto del número de pasos a través del dispositivo de cavitación sobre la sacarificación de polvo de *Eucalyptus sp.* cuando la etapa de lavado se intensifica por HC con circulación de sólido. (a) Evolución temporal de la masa de glucosa generada durante las primeras 6 h. (b) Rendimiento luego de 6 h. (c) Rendimiento luego de 28 h.

4.4.2 Sacarificación de CMC

La cavitación hidrodinámica, al igual que el ultrasonido o cavitación acústica, es capaz de cortar las cadenas de las moléculas de polímeros, modificando significativamente su viscosidad (Hou et al., 2018; Zupanc et al., 2024). Un estudio previo mostró que, como consecuencia de la circulación a través del cavitador, la viscosidad de una solución de CMC al 0,05% disminuyó entre un 27 y un 36% (Fleite et al., 2024). Este cambio se debe a la reducción del peso molecular medio del polímero como consecuencia de la ruptura de las moléculas de CMC para dar otras más pequeñas. Teniendo en cuenta este efecto, podría esperarse que la sacarificación enzimática se vea favorecida al poner en contacto a las celulasas con cadenas más cortas del sustrato. La **Figura 4.26** presenta los resultados de la sacarificación de CMC que ha circulado a través del dispositivo de cavitación durante diferentes números de pasos. Se observa que, para este sustrato, los resultados no presentan diferencias significativas en función del número de pasos a través del cavitador, ni con la solución original de CMC sin cavitator. La velocidad inicial es alta y se llega al rendimiento final relativamente rápido probablemente debido a que la CMC se solubiliza completamente en agua por lo cual no hay impedimento relacionado con el entrelazado de las fibras de celulosa. Además, la estructura ramificada de la CMC permite el ataque de la enzima por distintos puntos, independientemente del largo de las cadenas. El rendimiento máximo que se alcanza (~60%) no es tan alto como con el papel de filtro debido a los grupos carboxílicos que presenta, que no son atacados por la enzima.

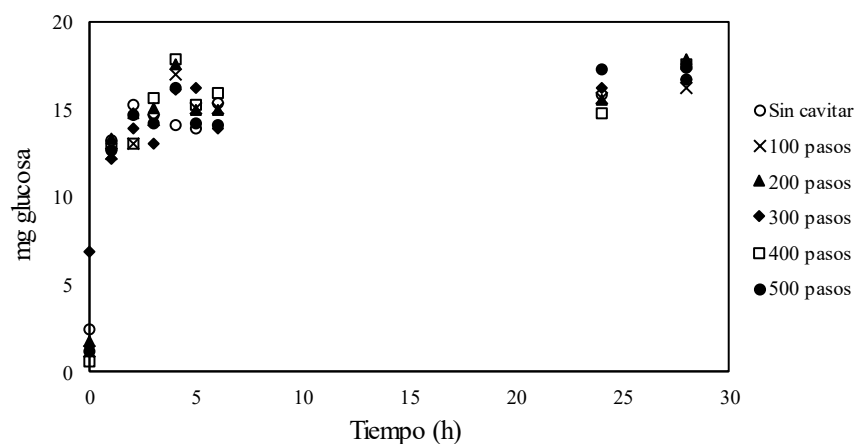


Figura 4.26. Efecto del número de pasos a través del dispositivo de cavitación para una solución acuosa de CMC 0.05%.

En consecuencia, este resultado evidencia que en ausencia de lignina y de problemas estéricos derivados de la estructura del sólido, la sacarificación de todos modos alcanza un menor rendimiento cuando las fibras de celulosa están parcialmente oxidadas. Teniendo en cuenta los resultados de la sección 4.4.1. y la capacidad oxidante de la cavitación hidrodinámica, especialmente en presencia de peróxido de hidrógeno, resulta razonable que no sea conveniente la disgregación total de las fibras de celulosa, que pudiera facilitar una oxidación parcial de algunos grupos oxhidrilos inducida por la cavitación, porque se alcanzaría menor rendimiento. Asimismo, someter al sólido a cavitación hidrodinámica durante tiempos muy prolongados, que también podría culminar en la oxidación parcial de algunos grupos oxhidrilos de la celulosa, tampoco sería conveniente porque podría conducir a disminuir el rendimiento final.

Capítulo 5 : Intensificación de la sacarificación mediante el empleo de un mezclador estático de contracción-expansión (CE)

Dentro de la búsqueda de estrategias de intensificación en la obtención de azúcares fermentables, se propuso el empleo de un mezclador estático de contracción-expansión (CE) tanto en la etapa de lavado, como así también la posibilidad de emplearlo para realizar la sacarificación enzimática como un proceso en recirculación. Los arreglos de contracción-expansión han resultado especialmente útiles para micromezclado (Yildirim, 2017) y tienen como principal ventaja su bajo costo de operación y baja pérdida de carga (Fleite et al., 2020a). Este capítulo incluye el diseño de un mezclador estático de CE, que involucró una primera etapa de modelado, el montaje del prototipo y su testeo al aplicarlo para preparar emulsiones. Si bien el objetivo de la tesis no es estudiar la operación de emulsificación, una buena performance del sistema para emulsificar puede indicar un buen desempeño en la disgregación de fibras de celulosa que se desean sacarificar. Una vez montado el prototipo y confirmado su buen desempeño como emulsificador, se lo empleó en la etapa de lavado y durante la sacarificación enzimática. A su vez, se incluyen resultados de estudiar el sistema de cavitación hidrodinámica con circulación de sólido como alternativa de intensificación durante el proceso de sacarificación enzimática.

5.1 Diseño del mezclador estático de contracción-expansión (CE)

5.1.1 Modelado

5.1.1.1 Determinación de la configuración óptima

La simulación del movimiento del líquido dentro de un mezclador estático, formado por sucesivas contracciones y expansiones interceptadas en el flujo, permite identificar las regiones de mayor turbulencia. En una contribución previa del grupo de investigación (Fleite et al., 2020a), se empleó el programa de acceso abierto (open-source) Gerris Flow Solver, desarrollado por Popinet (2003), para optimizar la configuración de un clarificador destinado al tratamiento de aguas residuales de un feedlot, con un mezclador estático inicial. En esta tesis, se utilizó el mismo software para realizar simulaciones computacionales de la fluidodinámica (Computational Fluid Dynamics – CFD) en 3 y 2 dimensiones (3D y 2D) para caracterizar el movimiento del líquido en un mezclador estático CE a diferentes caudales de líquido ($Re = 500 - 20000$). El modelo 3D se

utilizó para verificar la consistencia del modelo 2D. Dado que los resultados fueron similares, finalmente se utilizaron simulaciones 2D con fines de optimización debido al elevado costo computacional de las simulaciones 3D. Se realizaron simulaciones 2D del movimiento del líquido para diferentes disposiciones de CE con el fin de encontrar las características geométricas que conducen a la mayor turbulencia dentro del rango explorado de velocidades de líquido.

Las ecuaciones para describir el movimiento del líquido en 2D (radial-longitudinal) dentro de los elementos sucesivos de CE se resolvieron mediante simulación numérica directa o DNS (Direct Numerical Simulation) de las ecuaciones de Navier-Stokes para fluidos incompresibles, con un mallado cartesiano tipo “octree” (Lagrée et al., 2011; Popinet, 2003). El mallado octree de Gerris divide el espacio utilizando potencias de 2. En ese caso se empleó el algoritmo nativo del Gerris para el mallado adaptativo, a fines de minimizar el costo computacional requerido (Popinet, 2003; 2009). Se resolvieron las ecuaciones de continuidad (Ecuación 5.1) y de momento (Ecuación 5.2) para obtener el campo de velocidades del líquido y cuantificadores de turbulencia.

$$\nabla \cdot \mathbf{U} = 0 \quad (5.1)$$

$$\rho \left[\frac{\partial \mathbf{U}}{\partial t} + \mathbf{U} \cdot \nabla \mathbf{U} \right] = -\nabla P + \mu \nabla^2 \mathbf{U} \quad (5.2)$$

Donde $\mathbf{U}$ es el vector de velocidad, P es la presión del fluido, y μ es la viscosidad dinámica. Se estableció la condición de no deslizamiento en todas las interfaces sólido-líquido. La velocidad del líquido en la dirección de flujo en la entrada se estableció como la velocidad superficial en toda la sección. A la salida, se dejó una condición de contorno libre.

Se propuso un mezclador compuesto por una secuencia de 7 elementos (contracciones-expansiones, CE) en serie, para el cual se realizaron las simulaciones 2D para distintas configuraciones, a fin de obtener el campo de velocidades. Como variables se tomaron las relaciones de diámetro de los tramos de contracción y expansión D_C/D_E (entre 0,5 y 0,75) y la relación de longitudes de estos L_C/L_E (entre 0,1 y 1,0) con el objetivo de encontrar la configuración geométrica que genere la mayor turbulencia en el rango de velocidades estudiado.

Se registró el cambio en la media cuadrática del módulo de la componente vertical de la velocidad del fluido estimada por las simulaciones, a fin de encontrar la configuración que

maximizara esta variable. Los resultados indican que en general es conveniente tener elementos CE asimétricos, con contracciones de menor longitud que las zonas de expansión.

En la **Figura 5.1** se presenta el módulo de la componente vertical de la velocidad, promediada a lo largo del CE, para las distintas configuraciones estudiadas y una determinada velocidad de circulación ($Re=10000$). Es notable como la turbulencia depende fuertemente de las relaciones de diámetros y largos de las zonas de contracción y expansión. Los máximos se observan para una relación de diámetros D_C/D_E entre 0,55 y 0,59 y de largos L_C/L_E entre 0,2 y 0,3. Los mismos resultados cualitativos se obtuvieron para otros caudales dentro del rango estudiado ($Re=500 - 20000$).

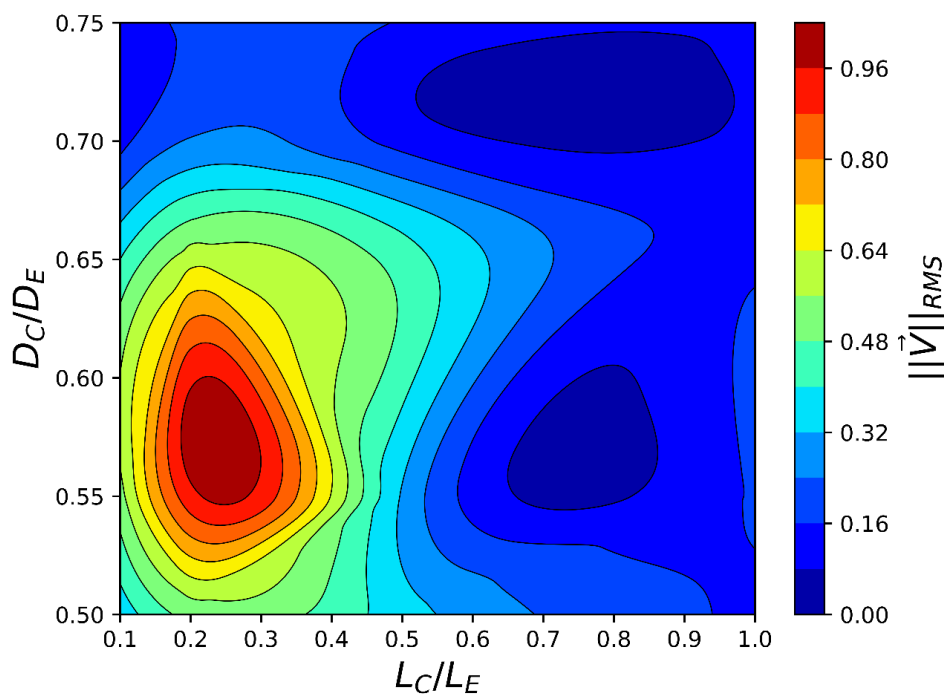


Figura 5.1. Variación del módulo de la media cuadrática de la componente vertical de la velocidad del fluido en función de las relaciones D_C/D_E y L_C/L_E . $Re= 10000$.

En base a los resultados, se decidió construir un dispositivo en acrílico con un arreglo de 7 contracciones-expansiones, con una relación D_C/D_E de 0,56 y una relación L_C/L_E de 0,24. Su longitud total es de 40 cm. El diámetro de contracción es de 2,3 cm, y el diámetro expandido es de 4,1 cm; la longitud de contracción de 1,1 cm, y la longitud de expansión de 4,5 cm (**Figura 5.2**).

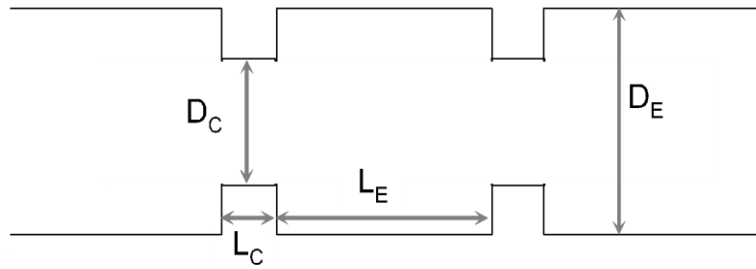


Figura 5.2. Esquema de dos elementos de contracción-expansión (CE).

5.1.1.2 Comportamiento de las gotas a través de un elemento de CE

Dado que el objetivo era utilizar el mezclador para lograr la desintegración de los RLC delignificados, se estudió la eficiencia de este sistema para desintegrar agregados. Dichos agregados se simularon como gotas inmiscibles. Es posible analizar el efecto de la configuración sobre la ruptura de gotas de un líquido inmisible mediante simulación. Fleite (2021) ha utilizado el enfoque del volumen de fluido (VOF) para simular el movimiento de flóculos, representándolos por gotas líquidas de alta tensión superficial y viscosidad. Siguiendo los resultados presentados por Lü et al. (2016), que ilustran que los remolinos generados por un CE pueden inducir una buena mezcla, Fleite et al. (2020b) probaron un mezclador estático CE para promover la coagulación y floculación en el tratamiento de aguas residuales de un feedlot. A pesar de la buena mezcla obtenida para los coagulantes, los flóculos formados no se asentaron adecuadamente, lo que llevó a una mala separación en un clarificador lamelar. La curva de sedimentación fue similar a la obtenida con flóculos formados en un tanque agitado, los cuales generalmente tienen una distribución de tamaños amplia y se comportan peor que los flóculos formados en un mezclador estático tipo Koflo, que dio el mejor comportamiento de sedimentación (Fleite, 2021). Para analizar la razón de tales resultados, que presumiblemente se debieran a una amplia distribución de tamaños de los flóculos, Fleite (2021) simuló el movimiento y la deformación de los flóculos al pasar por un elemento de CE, y los resultados indicaron una significativa desintegración de los flóculos en un mezclador estático tipo CE.

El enfoque del volumen de fluido (VOF) es uno de los métodos más comunes y precisos disponibles para la simulación de flujo bifásico. En este caso, para obtener el efecto del esfuerzo de corte sobre la ruptura de las gotas, seguimos el enfoque del volumen de fluido (VOF) utilizado por Tomar et al. (2010), basado en un método de acoplamiento bidireccional Euleriano-

Lagrangiano, implementado en Gerris (Popinet, 2003 y 2009). La ecuación de Navier-Stokes puede reescribirse para representar un flujo bifásico incompresible (Climent y Magnaudet, 2006; Tomar et al., 2010) como se describe en las Ecuaciones 5.3 a 5.5.

$$\rho[\partial_t \mathbf{U} + \mathbf{U} \cdot \nabla \mathbf{U}] = -\nabla p + \nabla \cdot (2\mu \mathbf{D}) + \sigma \delta_s \kappa \mathbf{n} + \Phi_p \quad (5.3)$$

Donde ρ es la densidad del fluido, μ es la viscosidad dinámica, p es la presión, $\mathbf{U}$ es el vector de velocidad del fluido y $\mathbf{D}$ es el tensor de deformación, definido en la Ecuación 5.4. σ es la tensión superficial, donde la función delta de Dirac, δ_s , indica que el término de tensión superficial está concentrado en la interfaz, κ y $\mathbf{n}$ son la curvatura de la interfaz y el vector normal a la interfaz, respectivamente. Φ_p es el término de momento que representa los efectos de la fase dispersa. El término de momento que describe la interacción VOF y el fluido, Φ_p , se calcula como se expresa en la Ecuación 5.5 (Climent y Magnaudet, 2006; Tomar et al., 2010).

$$D_{ij} = \frac{1}{2}(\partial_i U_j + \partial_j U_i) \quad (5.4)$$

$$\Phi_p = \lim_{V_f \rightarrow 0} \sum_{i=1}^{N_d} \frac{V_i}{V_f} \left[\rho_p^i \left(g - \frac{dv^i}{dt} \right) + \rho \left(\frac{DU}{Dt} - g \right) \right] \quad (5.5)$$

Donde N_d es el número de gotas, V_f es el volumen de fluido que contiene N_d gotas, V^i es el volumen de la gota "i", g es la aceleración de la gravedad y $\mathbf{v}^i$ es el vector de velocidad de la gota "i".

La malla se refina automáticamente según un criterio de refinamiento orientado a la topología (Chen y Yan, 2014) para tener en cuenta los cambios en las interfaces. La eficiencia de la adaptación de la malla es importante cuando se trata de la coalescencia y ruptura de interfaces, y se han propuesto muchos métodos. El refinamiento local de la malla o el agrupamiento en discretización quad/octree no es excesivamente exigente y puede realizarse en cada paso de tiempo, con un bajo impacto en el rendimiento del software. Más detalles sobre el enfoque y el método numérico utilizado pueden encontrarse en la literatura (Chen y Yang, 2014; Fuster et al., 2009; Popinet, 2009; Tomar et al., 2010).

Se asumió que las gotas eran inicialmente esféricas con una viscosidad entre 10 y 1000 veces mayor que la del agua. Por lo tanto, durante períodos cortos, se comportan como cuerpos rígidos.

Se consideraron cinco gotas equiespaciadas radialmente en el eje central para las simulaciones, y se registró su posición y forma en función del tiempo para analizar la región donde la deformación y la ruptura fueron más intensas. La tensión superficial y la densidad de las gotas se consideraron variando el número de Weber entre 0,5 y 15.

Las **Figuras 5.3** y **5.4** ilustran el movimiento, la deformación y la ruptura de las gotas de líquido simuladas en diferentes regiones de un elemento de CE, para $Re= 2000$ y 10000 , respectivamente. Cuando las gotas ingresan a la zona de contracción, se deforman debido a la aceleración del líquido inducida por la disminución de la sección.

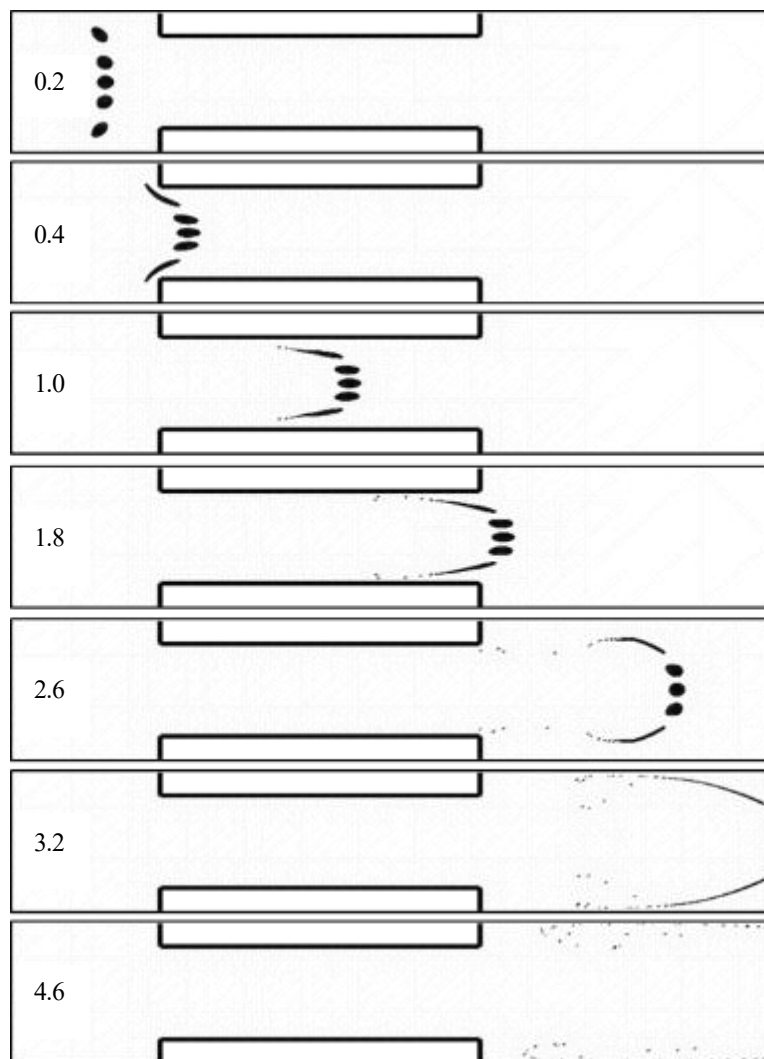


Figura 5.3. Efecto de un elemento CE sobre las gotas simuladas como VOF a $Re= 2000$. Los números a la izquierda de cada imagen indican el tiempo en segundos desde la entrada.

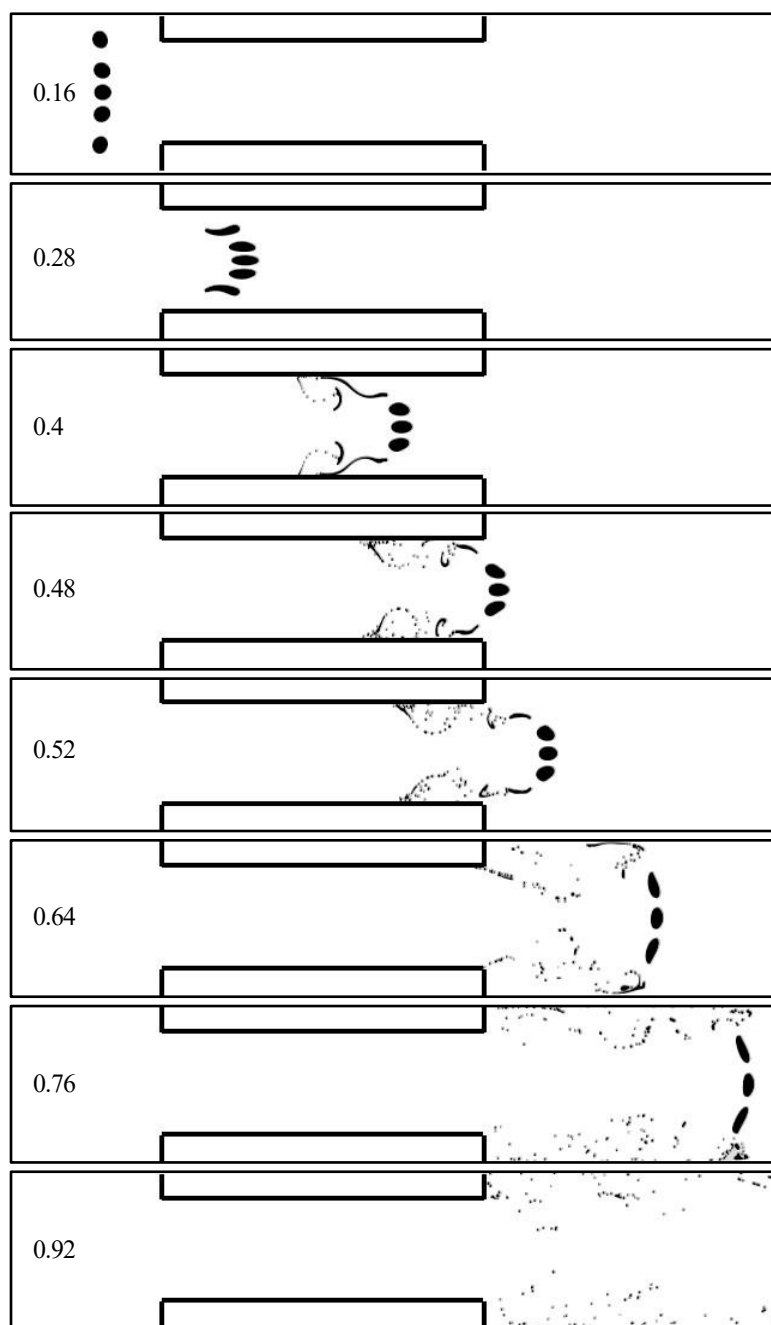


Figura 5.4. Efecto de un elemento CE sobre las gotas simuladas como VOF a $Re= 10000$. Los números a la izquierda de cada imagen indican el tiempo en segundos desde la entrada.

Para la menor velocidad del líquido (**Figura 5.3**), las gotas alejadas de la pared se mueven suavemente dentro de la contracción, mientras que las cercanas a la pared se estiran mucho más, deformándose y disgregándose progresivamente. Cuando las gotas deformadas se acercan a la

región expandida, desaceleran; las del centro recuperan su forma original y las cercanas a las paredes están demasiado elongadas, por lo que comienzan a romperse en gotas más pequeñas. La ruptura continúa en la región expandida y deviene en gotas de tamaños muy diversos, unas pocas gotas grandes que prácticamente conservan su forma inicial y muchas nuevas gotas pequeñas. Se observa que la ruptura de las gotas se induciría por i) elongación al entrar en la contracción ($t = 0,2$ a $0,4$ s), ii) compresión, estiramiento y esfuerzo de corte de las gotas cercanas a la pared ($t = 0,4$ a $1,8$ s) y iii) expulsión con un efecto de chorro y ruptura en muchas gotas de menor tamaño por turbulencia dentro de la región expandida ($t = 1,8$ a $3,2$ s). Las regiones de altas y bajas velocidades se pueden observar en la **Figura 5.5**, que ilustra el campo de velocidades. El efecto de chorro probablemente sería más fuerte si la región de expansión fuera lo suficientemente larga como para que el chorro se desarrolle más. Por lo tanto, los elementos de CE asimétricos (con una longitud de contracción corta y una longitud de expansión larga) llevarían a una mayor dispersión de las gotas.

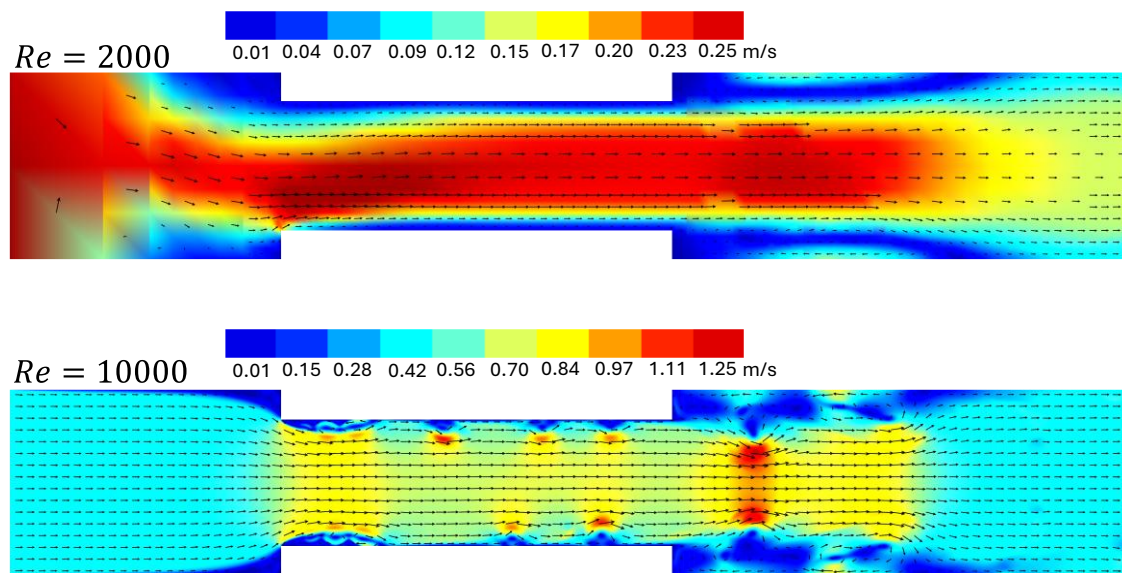


Figura 5.5. Campo de velocidades a través de la contracción y al inicio de la expansión para un elemento de CE a $t = 5$ s para $Re = 2000$ y a $t = 1$ s para $Re = 10000$.

Teniendo en cuenta la ruptura de gotas inducida por el elemento CE, es probable que un arreglo de elementos CE pueda usarse para promover la dispersión de líquidos inmiscibles para preparar emulsiones. En esta línea, Vasilev y Abiev (2018a, b) habían propuesto y estudiado un sistema pulsante como un nuevo tipo de dispersor estático. El arreglo se asemeja a una línea sucesiva de

contracciones y expansiones, pero con regiones convergentes y divergentes. En concordancia con los resultados obtenidos en la simulación del elemento CE, encontraron que, a medida que disminuía el número de Reynolds (en un rango de 90000 a 20000), el sistema pulsante propuesto generaba distribuciones de tamaños de gotas más amplias. También encontraron que para $Re < 80000$, la región de dispersión después de la contracción es la región cercana a la pared, como también se observó en la simulación del elemento CE (**Figuras 5.3 y 5.4**).

Cabe mencionar que la **Figura 5.3** corresponde al régimen laminar ($Re = 2000$), mientras que el mezclador estático tipo pulsante se evaluó dentro del régimen turbulento, para $Re > 20000$. La **Figura 5.4** ilustra el efecto de un elemento CE en el comportamiento de las 5 gotas de líquido simuladas para una condición en el régimen turbulento ($Re = 10000$). Antes y en la zona de entrada de la contracción, el comportamiento es similar al observado en $Re = 2000$, pero en una escala de tiempo diferente: las gotas se deforman debido a la aceleración del líquido inducida por la disminución de la sección. Para esta velocidad de líquido, la dispersión también se promueve cerca de la pared. Sin embargo, las gotas cercanas a la pared comienzan su desintegración dentro de la contracción y ya se crea una multitud de gotas pequeñas antes de ingresar a la región expandida. Además, se desarrollan pequeños vórtices que contribuyen a la desintegración y formación de gotas de diferentes tamaños. No obstante, aunque el fenómeno ocurre mucho más rápido, se observan etapas similares en las simulaciones.

Comparando con el sistema pulsante reportado por Vasilev y Abiev (2018a, b), se encuentra un comportamiento cualitativo similar con respecto a la dispersión de las gotas en el sistema CE. Aunque en el caso del mezclador tipo pulsante la ruptura de las gotas se atribuyó al efecto de los remolinos turbulentos, los resultados de la simulación indican que el esfuerzo de corte en la pared, el perfil de velocidades del líquido (**Figura 5.5**) y las sucesivas aceleraciones y desaceleraciones bruscas tienen una fuerte influencia. Por lo tanto, las gotas también pueden dispersarse a velocidades significativamente más bajas, lo que implica un menor consumo de energía, debido a la turbulencia asociada con las modificaciones bruscas de velocidad.

5.1.2 Evaluación del dispositivo CE como mezclador/emulsificador

Una vez construido el dispositivo, fue testado como emulsificador para mezclas de aceite de girasol en agua con el agregado de Tritón X100 como surfactante. Para ello se lo conectó en un sistema en recirculación aguas abajo de una bomba centrífuga como se observa en la **Figura 5.6**.

La bomba posee un variador de frecuencia que permitió regular la misma en un rango de 5 a 50Hz, generando así velocidades de rotación de 140 a 1400rpm, respectivamente.

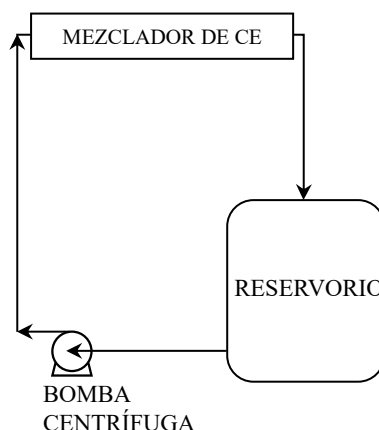


Figura 5.6. Esquema del setup empleado para evaluar la eficiencia del CE como emulsificador.

Los ensayos realizados tienen por objetivo evaluar la estabilidad de emulsiones de aceite de girasol en agua con Tritón X100 obtenidas gracias a la dispersión que se genera una vez que el fluido atraviesa el dispositivo de CE. Los resultados se contrastaron con aquellos obtenidos en un sistema igual pero que tiene un tramo de caño recto con el mismo diámetro interno que el dispositivo de CE, pero sin contracciones. Esto último se hace para poder tener en cuenta el efecto que pudiera tener la bomba centrífuga sobre las emulsiones obtenidas. También se compararon con aquellas emulsiones obtenidas en un batch empleando un agitador magnético.

En primer lugar, se estudiaron distintas relaciones volumétricas de aceite/agua (5/95, 10/90, 20/80) y de surfactante/aceite (0.1/10, 1/10, 2/10 para cada relación de aceite/agua), generando emulsiones con un agitador magnético, a fin de encontrar la composición que produce la emulsión más estable. El mejor resultado en términos de estabilidad se obtuvo para una composición de 5%v/v de aceite (una relación de 5/95 de aceite/agua) con el agregado de un 0,5% de surfactante en la solución (una relación de 1/10 de surfactante/aceite). Luego, esta composición fue la empleada en todos los ensayos realizados para testear la capacidad emulsificadora del dispositivo de CE diseñado.

Los ensayos en el dispositivo de CE se llevaron a cabo para distintas velocidades de circulación ($Re=2000$, 10000 y 16000). Se tomaron muestras a diferentes números de pasos por el dispositivo, de 10 a 250. Lo mismo se realizó para la configuración con el tramo recto sin contracciones. El

volumen total de circulación se mantuvo siempre en 5 L, y los ensayos se llevaron a cabo a una temperatura de 20°C. El aceite de girasol empleado tiene una viscosidad de 80 ± 3 mPa.s (medida en un reómetro Anton Paar MCR302) y una densidad de 904 kg.m^{-3} (determinada con picnómetro). La tensión superficial se estimó a partir de bibliografía en 37 mN.m^{-1} (Cong et al., 2020). Se empleó agua destilada para evitar cualquier tipo de interferencia y de efectos no controlados. Como surfactante se empleó TritónX100 (Biopack), que es comúnmente empleado para emulsiones de aceite en agua.

La estabilidad de las emulsiones puede ser caracterizada mediante diferentes técnicas analíticas que incluyen turbidimetría, imágenes ópticas, medición de impedancia, espectroscopía Raman, entre otras. La turbidimetría es la más utilizada por su alta precisión y su fácil aplicación (Deb et al., 2022; Shahidi et al., 2017). En este caso, la estabilidad de las emulsiones generadas se determinó por turbidimetría, midiendo la absorbancia a 860nm en función del tiempo durante 300s.

Para cada ensayo, se llenó el tanque reservorio con 5 L de la mezcla líquida de aceite, agua y surfactante que luego fue recirculada a través del dispositivo de CE. Para una dada velocidad de flujo, se tomaron muestras de la emulsión generada para distintos números de pasos a través del mezclador, desde 10 hasta 250. Estas muestras fueron analizadas por turbidimetría a fin de determinar la velocidad inicial de separación de fases. Análogamente, se realizaron los ensayos con un tramo recto sin contracciones y se compararon los resultados de las turbidimetrías.

Las **Figuras 5.7 y 5.8** presentan las curvas de turbidez en función del tiempo para las emulsiones obtenidas en los dos sistemas trabajando a $Re=10000$ y 2000 , respectivamente. La **Tabla 5.1** resume las velocidades de separación de fases, calculadas como la pendiente de las curvas de las **Figuras 5.7 y 5.8** durante los primeros 300 s, tanto para los sistemas en recirculación (con y sin el mezclador de CE) y para las emulsiones obtenidas en batch con el agitador magnético.

Para un $Re=10000$, la velocidad de separación de fases de la emulsión generada gracias a la circulación luego de 100 pasos por el mezclador de CE es 2,4 veces menor que para aquella generada con un agitador magnético. Incluso se observa que la emulsión generada luego de sólo 10 pasos a través del CE presenta una velocidad de separación de fases levemente mayor, indicando que es posible obtener una buena emulsión con poco tiempo de circulación. Para el sistema en el que se reemplazó el mezclador de CE por un tramo de caño recto, se obtuvieron emulsiones significativamente menos estables. Para alcanzar una emulsión medianamente estable es necesario que la mezcla líquida circule al menos 100 pasos y a mayores velocidades. De todos

modos, para la mayor velocidad posible de circulación ($Re=16000$ que equivale a la bomba operando a su velocidad nominal), la emulsión alcanzada circulando 100 pasos a través del dispositivo de CE tiene una velocidad inicial de separación de fases un 20% menor que aquella obtenida circulando por el caño recto.

Si bien para un $Re=2000$ se obtuvieron emulsiones menos estables, fue posible prepararlas incluso con la mezcla circulando 10 pasos a través del CE, mientras que para el caño recto no fue posible lograr una emulsión ni siquiera luego de 250 pasos. En este último caso, las fases permanecieron separadas evidenciando que la bomba por sí sola no promueve la emulsificación a bajas velocidades de circulación.

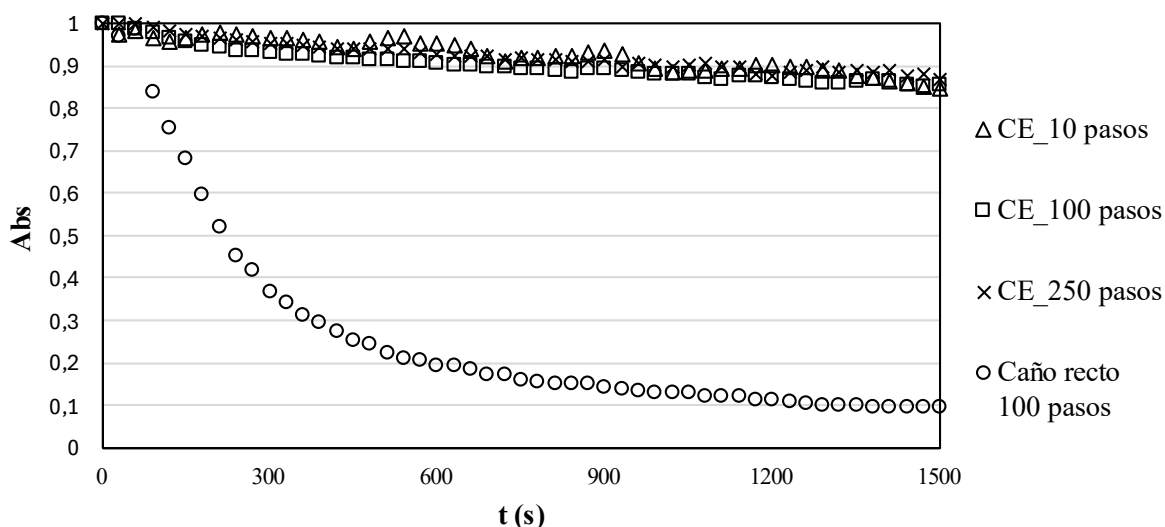


Figura 5.7. Curvas de turbidez en función del tiempo de las emulsiones obtenidas a $Re= 10000$.

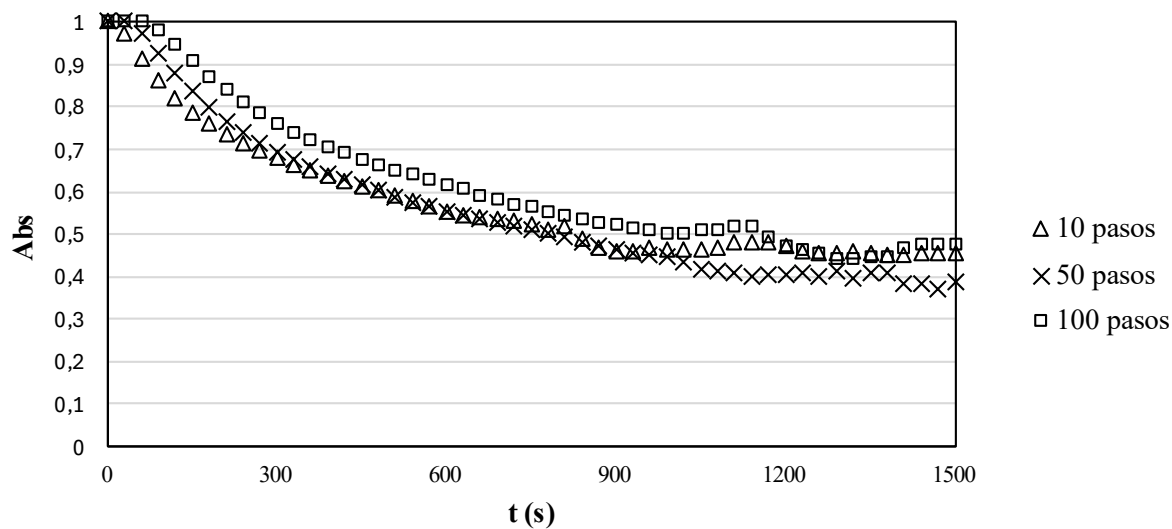


Figura 5.8. Curvas de turbidez en función del tiempo de las emulsiones obtenidas a $Re = 2000$.

Tabla 5.1. Velocidad inicial de separación de fases evaluada a partir del cambio en la turbidez durante los primeros 300 s para mezclas de 5% v/v de aceite de girasol en agua con un 0.5% de Tritón X100 como surfactante, para los diferentes sistemas y condiciones estudiados.

Sistema	Re	Número de pasos				
		10	50	100	250	
CE	2000	4,78	4,48	3,25	-	Velocidad inicial de separación (Δ_{abs}/h)
	10000	0,31	-	0,22	0,24	
	16000	-	-	0,23	-	
Tramo Recto	2000	No se formó una emulsión				
	10000	-	-	8,48	-	
	16000	-	-	0,30	-	
Recipiente con agitador magnético	0,51					

5.2 Lavado en recirculación intensificado por la promoción de turbulencia impuesta por un mezclador estático de CE

Una vez diseñado el dispositivo de CE y habiendo testeado su funcionalidad como mezclador emulsificador, se decidió emplearlo en primera medida como método de intensificación en la etapa de lavado del sólido. Teniendo en cuenta los resultados presentados en el Capítulo 3, se decidió realizar estos ensayos con *Eucalyptus sp.* siendo el residuo lignocelulósico con el cual se obtuvieron mayores rendimientos de glucosa. Asimismo, también se empleó papel de filtro como sustrato de referencia, al igual que en los capítulos anteriores.

5.2.1 Efecto del número de pasos a través del CE

El dispositivo de CE diseñado se empleó en la etapa de lavado en un sistema igual al que se utilizó para el lavado intensificado con cavitación hidrodinámica. En este caso, el sólido, con una granulometría entre 590 y 3350 μm , circula a través del sistema con una carga de 1 g/L. Análogamente a lo estudiado para el lavado con HC, se decidió en primera medida establecer el efecto del número de pasos a través del mezclador de CE.

En la **Figura 5.9** se presentan los resultados de las sacarificaciones de papel de filtro que previamente fue sometido al lavado en recirculación intensificado con el mezclador estático de CE. Se observa que a medida que aumenta el número de pasos la producción de glucosa fue en aumento hasta los 50 pasos, como así también la velocidad inicial de reacción. Al superar los 50 pasos, si bien pareciera haber un efecto negativo sobre el rendimiento y la velocidad inicial, las diferencias en los resultados se encuentran dentro del error del método de determinación de glucosa.

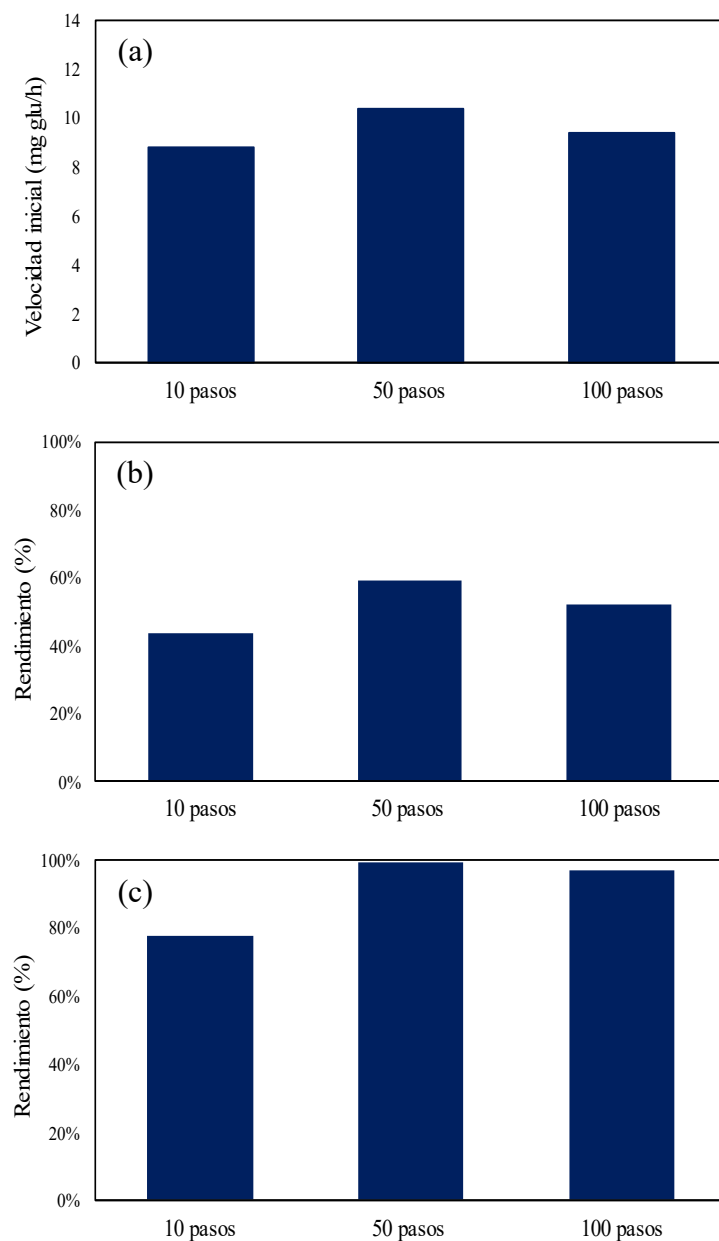


Figura 5.9. Efecto del número de pasos a través del dispositivo de CE para papel de filtro. (a) Velocidad inicial de generación de glucosa. (b) Rendimiento luego de 6 h. (c) Rendimiento luego de 28 h.

Al igual que lo presentado en el Capítulo 4, es probable que estos resultados tengan que ver con el efecto de humectación del papel, generando que a mayor número de pasos y en consecuencia mayor tiempo de contacto del papel con el agua de lavado, las fibras se separen más y se encuentren más disponibles para la actividad enzimática. De todos modos, los resultados de haber expuesto al

papel de filtro a inmersión por 1 h o de haberlo recirculado y expuesto a cavitación hidrodinámica sin y con peróxido de hidrógeno, solamente alcanzaron un rendimiento del 80%, mientras que en este caso se llegó al 100% de rendimiento. Esto sugeriría que la recirculación intensificada con promoción de turbulencia por el mezclador de CE, que tiene muy baja pérdida de carga, pero es capaz de disgregar muy eficientemente gotas y flóculos, también disgrega y humecta los segmentos de 5x5 mm de papel de filtro, permitiendo que la hidrólisis enzimática progrese hasta consumirlo completamente.

La **Figura 5.10** muestra los resultados de las sacarificaciones de *Eucalyptus sp.* con una granulometría entre 590 y 3350 μm que fue lavado en recirculación con intensificación por efecto de intercalar el mezclador de CE luego de la etapa de hidrólisis ácida-oxidativa. Para este sustrato, se observa que si bien la velocidad inicial de reacción se ve levemente favorecida al aumentar el número de pasos (un incremento del 10%), el rendimiento no mejora, e incluso da levemente menor. Además, no se observaron aumentos en el rendimiento luego de 6 h de sacarificación de aquellos sustratos que fueron lavados durante 50 y 100 pasos. Este resultado indica que el efecto de la cavitación como método de intensificación no es solamente el de incrementar la disgregación y acceso a las fibras de celulosa, sino también el de eliminar simultáneamente los compuestos orgánicos que pueden quedar en la matriz luego de la delignificación, y que pueden inhibir la acción de la enzima.

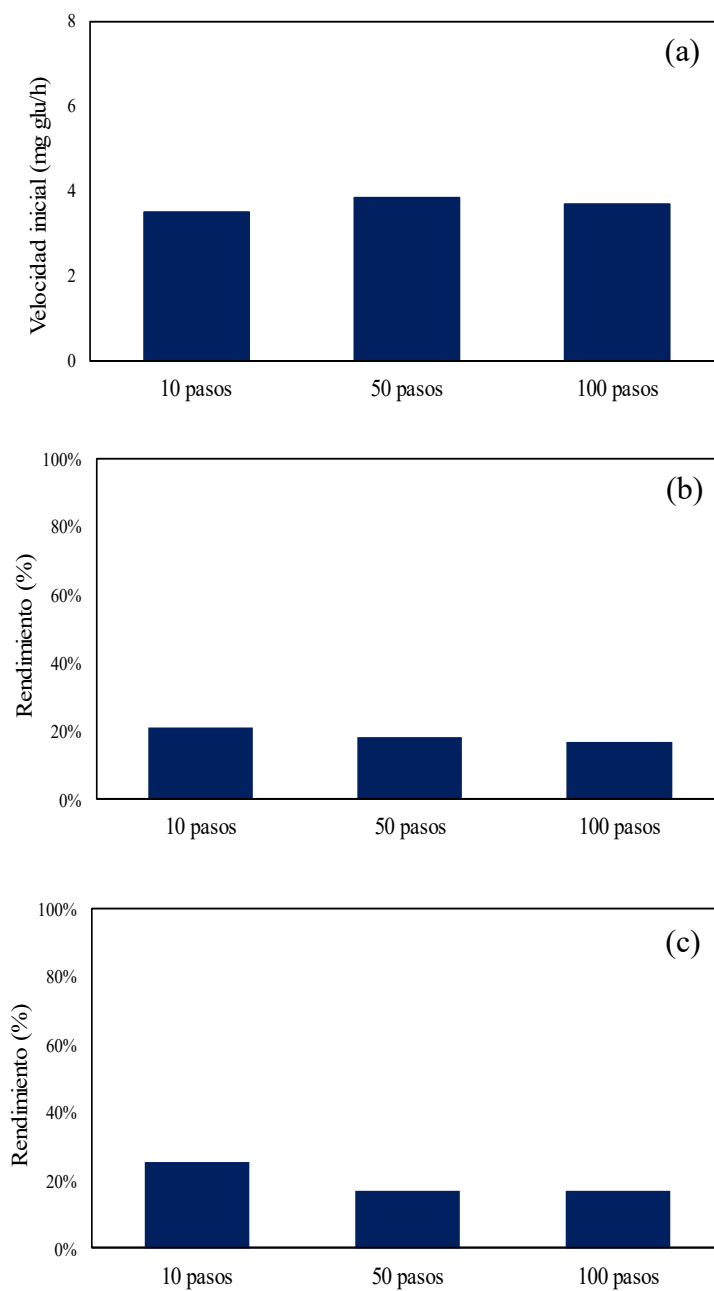


Figura 5.10. Efecto del número de pasos a través del dispositivo de CE para *Eucalyptus sp.* (a) Velocidad inicial de generación de glucosa. (b) Rendimiento luego de 6 h. (c) Rendimiento luego de 28 h.

5.2.2 Comparación con los distintos procedimientos de intensificación de la etapa de lavado estudiados

En la **Figura 5.11** se comparan los resultados de las sacarificaciones de papel de filtro que previamente fue sometido a una etapa de lavado intensificada con cavitación hidrodinámica sin y con peróxido de hidrógeno o con promoción de turbulencia por intercalar el mezclador estático de CE. Como referencia se incluyen el papel de filtro sin mojado previo (crudo) y el que fue mojado por inmersión con agitación mediante una bomba de pecera durante el mismo tiempo.

La **Figura 5.12** presenta las imágenes de la microscopía SEM de las muestras de papel de filtro que fueron sometidas a los distintos procedimientos de lavado. En ellas se observa que las muestras que fueron lavadas en recirculación empleando el mezclador de CE como promotor de turbulencia, presentan una superficie mayormente rugosa, similar a aquellas que fueron lavadas empleando HC como proceso de intensificación. Las fibras se observan más abiertas, rugosas y desentrelazadas comparando con aquellas muestras que sólo fueron lavadas por inmersión o con HC, aunque no se ven tan adelgazadas como las que han experimentado una intensificación por HC con el agregado de H_2O_2 . Es posible que en el caso de HC con peróxido de hidrógeno, parte de las fibras se hayan disgregado parcialmente, modificando su diámetro.

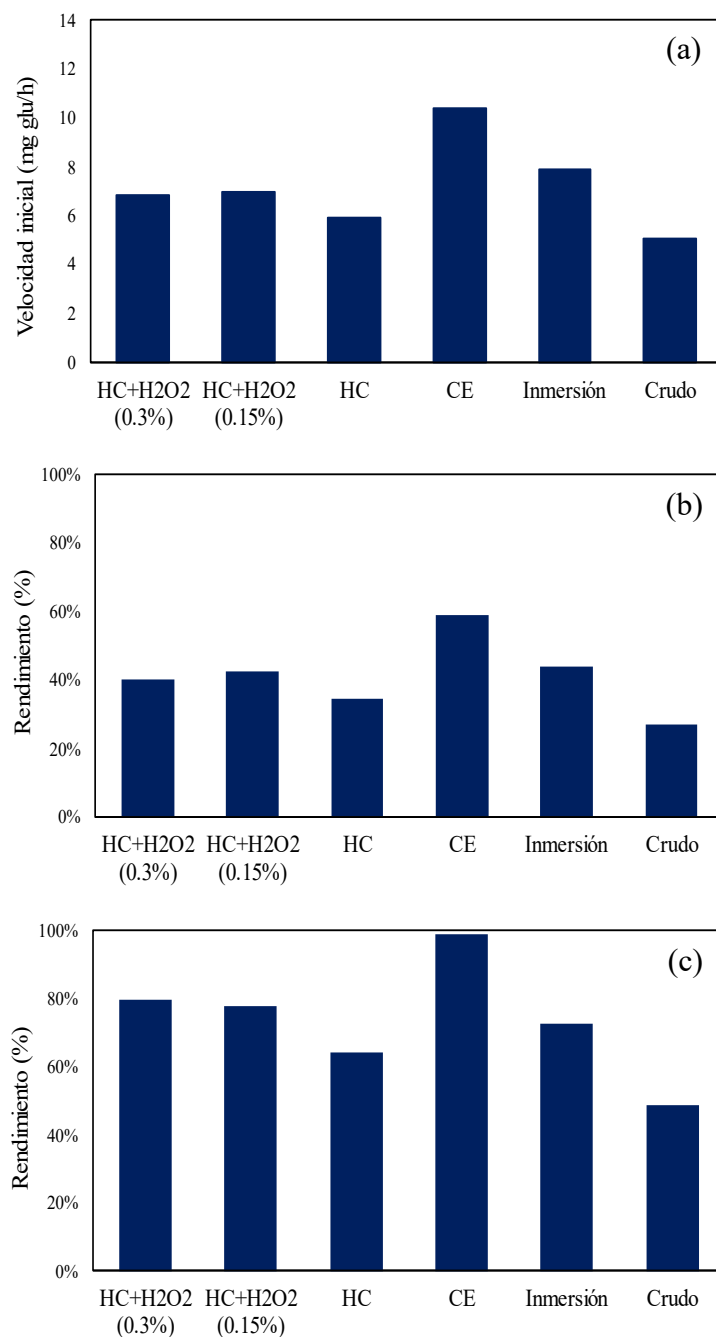


Figura 5.11. Comparación de los efectos de los distintos métodos de lavado sobre la sacarificación enzimática de papel de filtro. (a) Velocidad inicial. (b) Rendimiento de glucosa luego de 6 h. (c) Rendimiento de glucosa luego de 28 h.

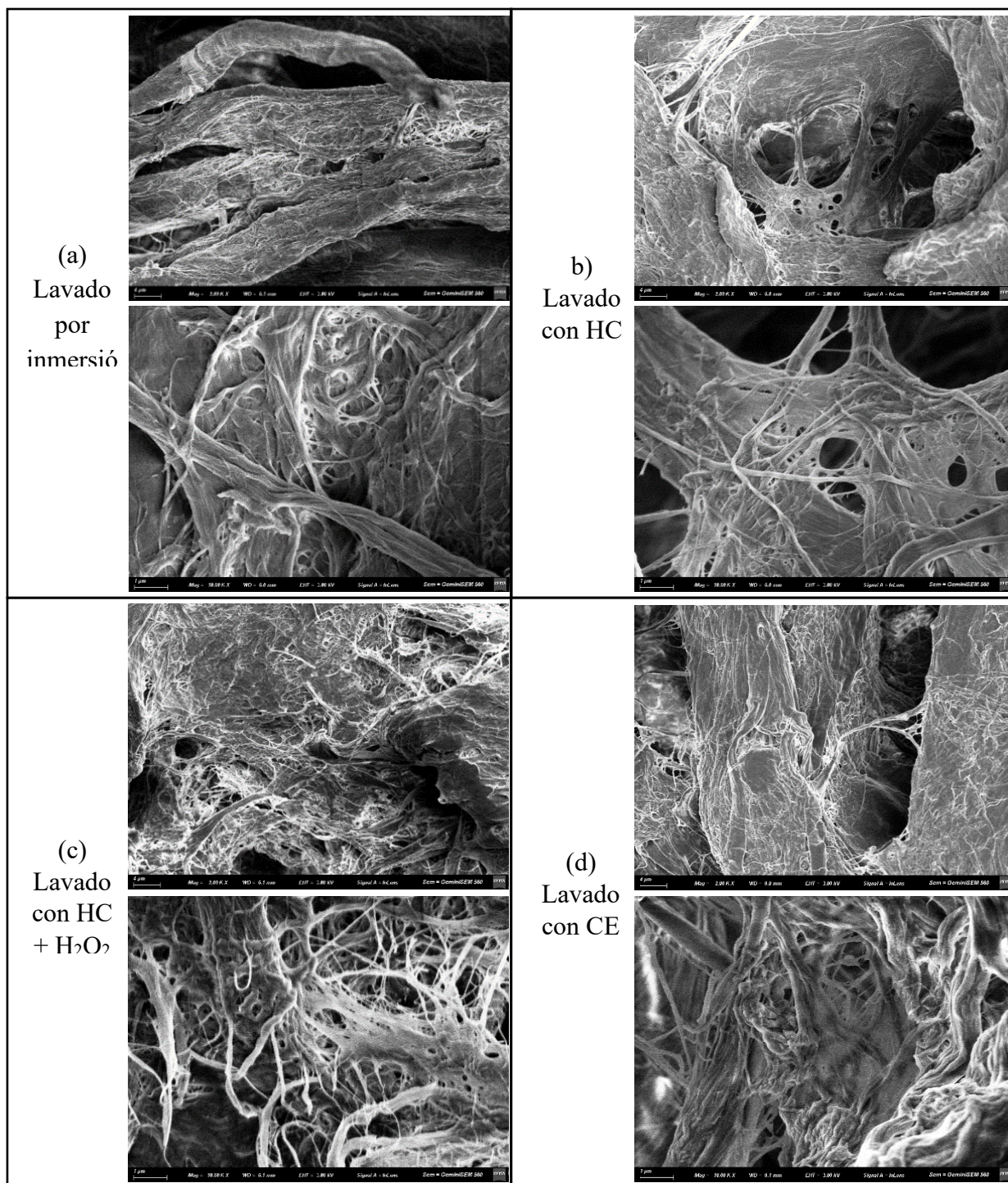


Figura 5.12. Microscopía de barrido electrónico (SEM) de papel de filtro sometido a distintos procedimientos de lavado. (a) Lavado por inmersión, (b) Lavado en recirculación intensificado por cavitación hidrodinámica (c) Lavado en recirculación intensificado por cavitación hidrodinámica con adición de H₂O₂ (0.3%). (d) Lavado en recirculación empleando el mezclador de CE como promotor de turbulencia. Magnificación aproximada: x2000 (arriba) y x10000 (abajo).

Evidentemente, cuando el sustrato es papel de filtro (100% celulosa), humectar el papel es un paso necesario para mejorar la sacarificación posterior. Como se mencionó en el Capítulo 1, esto fue varias veces sugerido previamente y estudiado en trabajos que analizan la sacarificación de celulosa pura. El rendimiento que se obtiene es alto, cerca del 50% y sube a más de 70% por la humectación previa, lo que indica la buena eficiencia de la formulación enzimática de Novozymes utilizada. De todos modos, la cavitación hidrodinámica conduce a mejorar el rendimiento, y el uso del mezclador de CE lo lleva al 100%. Esto indica que, para esta relación sólido/líquido, se puede alcanzar el 100% de conversión de celulosa a glucosa mediante un procedimiento de remojado que a su vez desintegre las fibras convenientemente, sin oxidarlas.

El uso de cavitación hidrodinámica también conduce a un mayor rendimiento, pero es probable que induzca una oxidación parcial de algunos grupos oxhidrilos que impide alcanzar el 100% de rendimiento. El mezclador de CE desintegra las fibras sin promover oxidación de compuestos orgánicos porque es un proceso energéticamente mucho más moderado que la cavitación, no se alcanzan presiones y temperaturas locales tan elevadas como las que se generan por la implosión de la burbuja. En consecuencia, tampoco es esperable que haya generación de radicales libres capaces de oxidar compuestos orgánicos como en el caso de la cavitación. Estos resultados indicarían que, si el sustrato a sacarificar contiene únicamente celulosa pura, sería más conveniente emplear un promotor de turbulencia para intensificar el mojado, que utilizar cavitación hidrodinámica, tanto para evitar la oxidación como por razones económicas, dado el menor consumo de energía.

En la **Figura 5.13** se comparan los resultados de las sacarificaciones de aserrín de *Eucalyptus* *sp.* delignificado mediante HPAC y sometido posteriormente a procedimientos de lavado intensificados por cavitación hidrodinámica con peróxido de hidrógeno, o por intercalar el mezclador estático de CE como promotor de turbulencia. Como referencia se incluye los resultados de la sacarificación del RLC sin pretratamiento (crudo).

Al igual que en el caso de las muestras de papel de filtro, las muestras de *Eucalyptus* *sp.* delignificadas y lavadas por los distintos procedimientos propuestos, fueron examinadas por microscopía SEM para observar sus cambios morfológicos (**Figura 5.14**). En este caso, las muestras sometidas al lavado en recirculación intercalando el mezclador de CE presentan fibras más desordenadas que el resto. Si bien la superficie se observa más rugosa que en la muestra cruda y en la que fue lavada por inmersión, aquella cuyo lavado fue intensificado por HC es la que mayor

rugosidad presenta, pudiendo ser ésta una razón más que mejore la accesibilidad a la enzima. Para este sustrato, la microscopía SEM indicaría que el mezclador CE no resulta capaz de desentrelazar las fibras de la matriz delignificada.

En este caso, claramente la cavitación hidrodinámica es la mejor opción porque además de promover la disgregación de las fibras de celulosa que formaban la matriz del residuo, es capaz de remover compuestos inhibidores que pudieran haber quedado residuales de la etapa de delignificación y/o residuos de lignina en la matriz. En este caso, la capacidad oxidante de la cavitación hidrodinámica es conveniente para eliminar estos compuestos, que al permanecer adsorbidos al sólido finalmente ocasionan la inhibición de la enzima. El mezclador estático de CE no tiene la capacidad de remover estos compuestos y los resultados de promover el lavado mediante su empleo son similares al lavado tradicional por inmersión con agitación.

Las **Figura 5.15** ilustra los espectros obtenidos por FTIR de las muestras de *Eucalyptus sp.* delignificadas por HPAC y posteriormente sometidas a diferentes procedimientos de lavados, en contraposición con el espectro del *Eucalyptus sp.* crudo y del papel de filtro. La **Tabla 5.2** presenta el contenido de lignina de las distintas muestras de *Eucalyptus sp.*, el cual fue estimado a partir de las espectroscopías FTIR, como en el Capítulo 4, considerando en particular la señal alrededor de 1512 cm^{-1} , que corresponde a la vibración de anillos aromáticos, los cuales sólo están presentes en la lignina. Se observa e integra la zona entre 1490 y 1530 cm^{-1} , y se refiere al valor de integración del crudo, para el cual se ha determinado el contenido según la norma TAPPI. Se observa que el contenido de lignina es muy bajo, alrededor del 3% en todos los casos, resultantes del buen proceso de delignificación, pero permanece una pequeña concentración residual, que podría estar dentro del error del método. Dicha concentración es levemente menor para los procedimientos de lavado en recirculación a pesar de que los resultados son comparables para los tres procedimientos de lavado si se tiene en cuenta el error. Estas pequeñas diferencias pueden deberse a la turbulencia generada en los procedimientos de lavado en recirculación, siendo mayor en el caso del sistema que incluye el cavitador de tubo Venturi. Este resultado indicaría que las diferencias de rendimiento en este caso no se deben fundamentalmente al contenido residual de lignina, y que podrían estar más relacionadas con compuestos inhibidores no aromáticos que se generen producto de la oxidación parcial de oligosacáridos y queden adsorbidos en el sólido, además de las diferencias morfológicas observadas en las microscopías SEM.

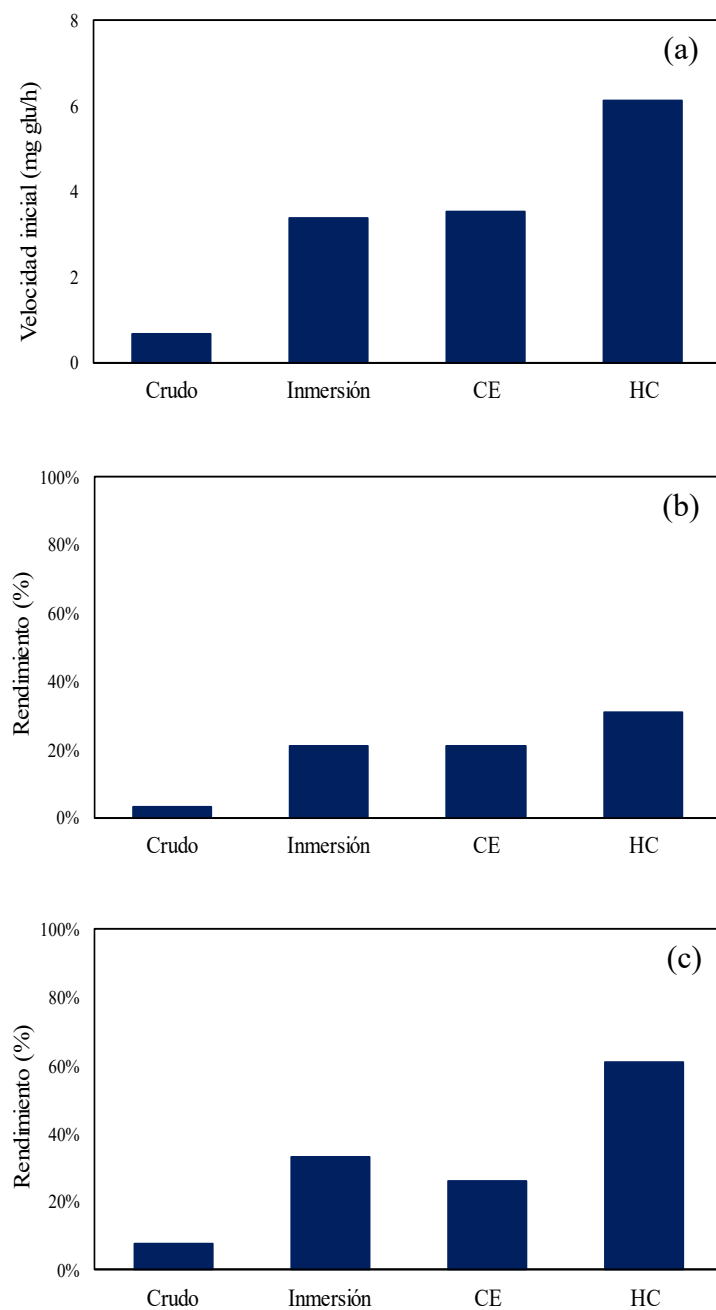


Figura 5.13. Comparación de los efectos de los distintos procedimientos de lavado sobre la sacarificación enzimática de *Eucalyptus sp.* (a) Velocidad inicial. (b) Rendimiento de glucosa luego de 6 h. (c) Rendimiento de glucosa luego de 28 h.

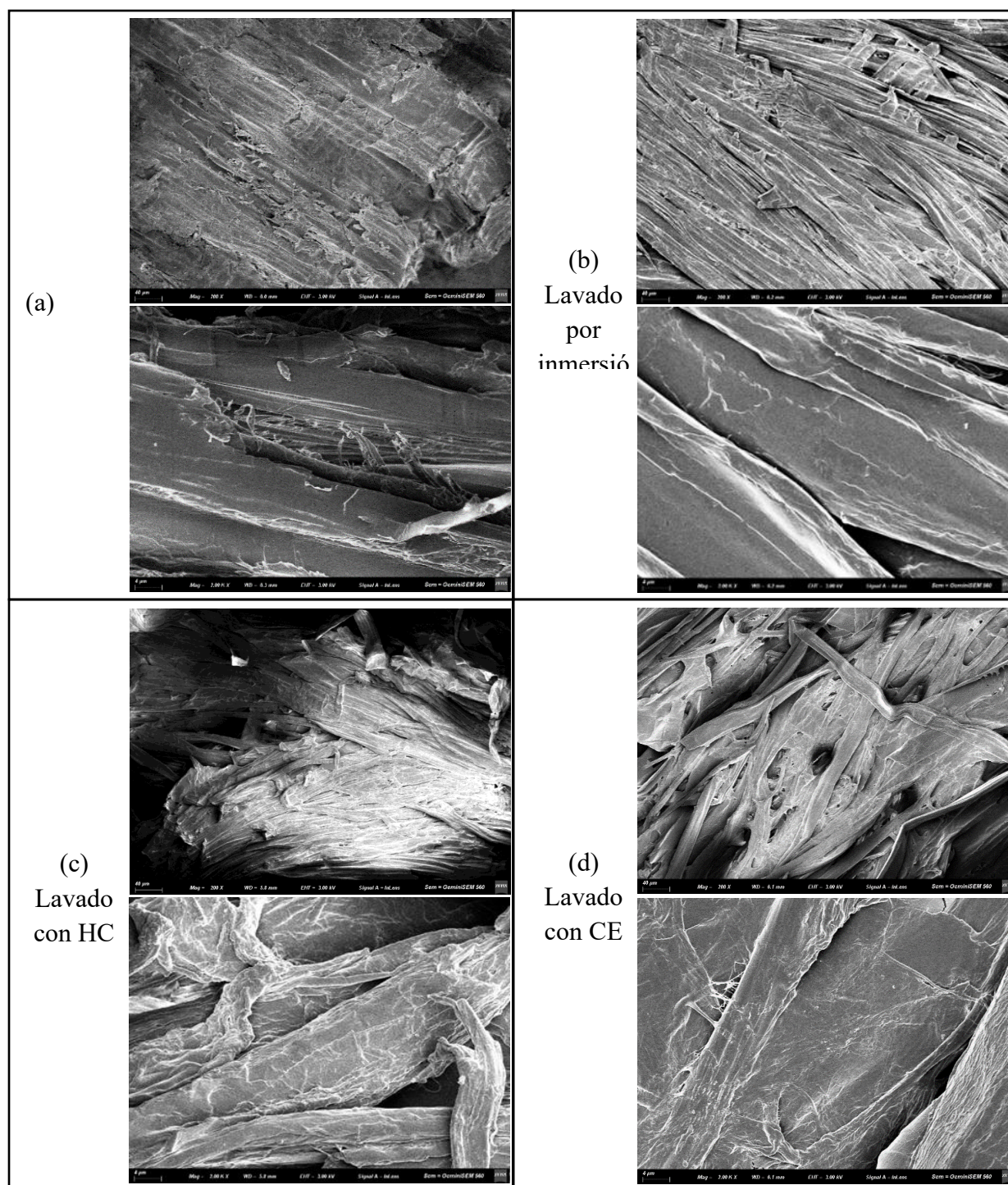


Figura 5.14. Microscopía de barrido electrónico (SEM) de *Eucalyptus sp.* sometidos a diferentes tratamientos. (a) crudo (sin pretratamiento), (b) delignificado con HPAC y lavado por inmersión, (c) delignificado con HPAC y lavado en recirculación con intensificación por cavitación hidrodinámica, (d) delignificado con HPAC y lavado en recirculación empleando el mezclador de CE como promotor de turbulencia.

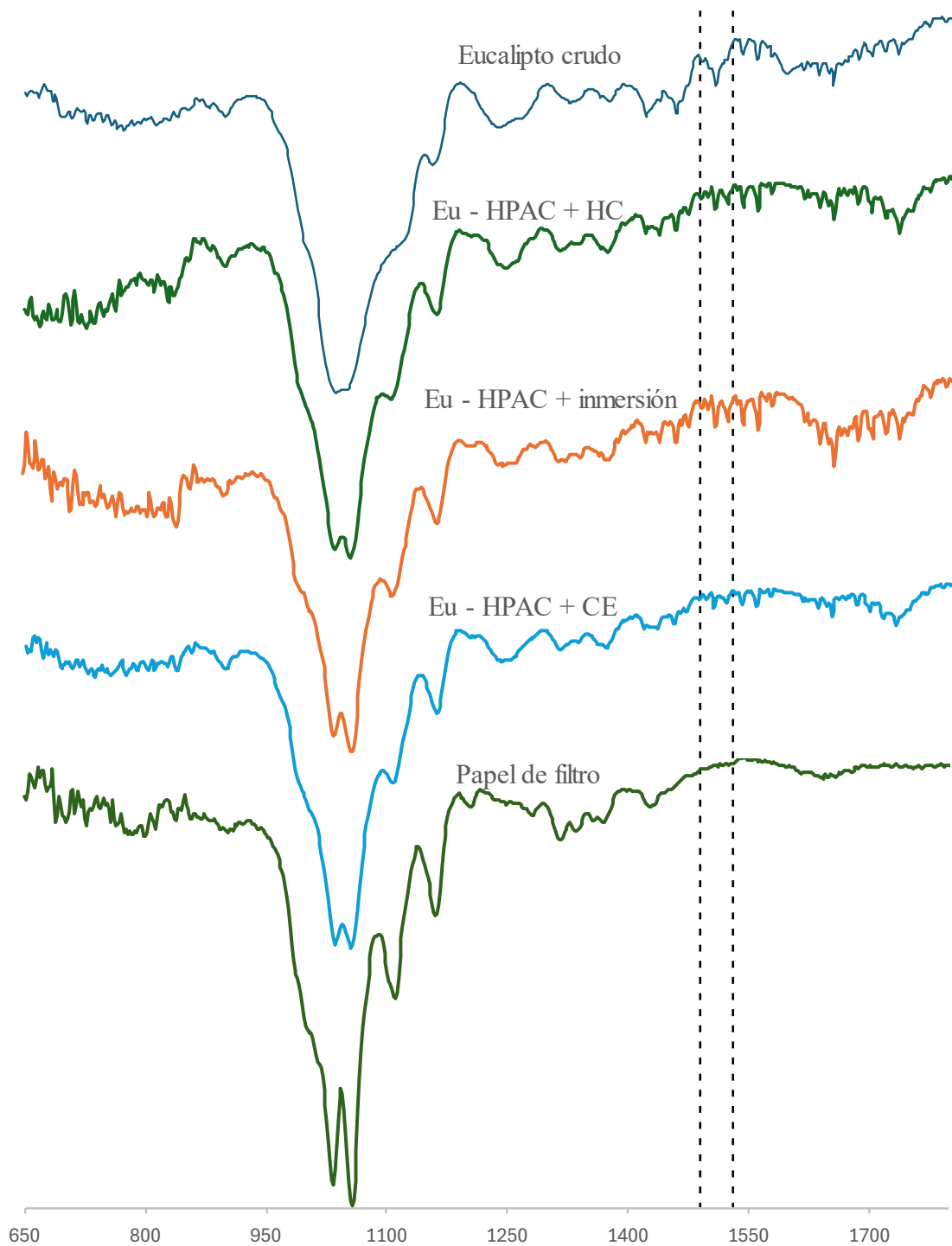


Figura 5.15. Espectros obtenidos por FTIR de las muestras de *Eucalyptus sp.*, cruda (sin pretratamiento) y delignificadas con HPAC y lavadas por inmersión, en recirculación intensificada por cavitación hidrodinámica o en recirculación intercalando el mezclador de CE como promotor de turbulencia. Se incluye también la muestra de papel de filtro para referencia comparativa.

Tabla 5.2. Contenido de lignina de *Eucalyptus sp.*, teniendo en cuenta el procedimiento de lavado al que fueron sometidas las muestras, estimada a partir de la norma TAPPI o de espectroscopía FTIR.

Procedimiento de lavado	Contenido de lignina (%)			
	Crudo (sin delignificar y sin lavar)	Inmersión	HC	CE
<i>Eucalyptus sp.</i>	24*	3,3**	2,7**	3,0**

* determinadas por norma TAPI T222

** determinada a partir de FTIR considerando los resultados de *Eucalyptus sp.* crudo.

5.3 Sacarificación en recirculación

5.3.1 Sacarificación en recirculación intercalando el mezclador estático de CE como promotor de turbulencia

Habiendo sido útil el dispositivo de CE como intensificador de la etapa de lavado y teniendo en cuenta que incluso a bajas velocidades de circulación a través de éste se logra promover un buen mezclado, se decidió testearlo como método de intensificación de la sacarificación enzimática. La influencia del mezclado durante la sacarificación ha sido estudiada, como se ha presentado en el Capítulo 1, sin que hasta el momento haya una conveniencia establecida respecto del procedimiento óptimo. En este caso, la hipótesis fue que la disgregación de las fibras y el suave mezclado podría contribuir a mejorar el contacto entre la enzima y el sustrato.

La **Figura 5.16** presenta los resultados de las sacarificaciones de papel de filtro llevadas a cabo en recirculación cuando en la misma se intercalaba el mezclador estático de CE como promotor de turbulencia. Los ensayos se realizaron a distintas velocidades de flujo, pero respetando todos ellos las relaciones sólido/líquido y enzima/sólido de los ensayos en batch presentados en los Capítulos 3 y 4. Se observa que en todos los casos se obtuvieron rendimientos considerablemente más bajos que los obtenidos en batch, sin siquiera alcanzar el 40% al cabo de las 24 h. El rendimiento es leve mayor a baja velocidad de flujo ($Re = 2000$), sugiriendo que el problema principal es que la enzima se inactiva por los esfuerzos a los que resulta sometida como consecuencia de la circulación a través del sistema. En consecuencia, se concluye que no es conveniente promover la

turbulencia durante la sacarificación enzimática para evitar la inhibición de la enzima por estrés hidrodinámico.

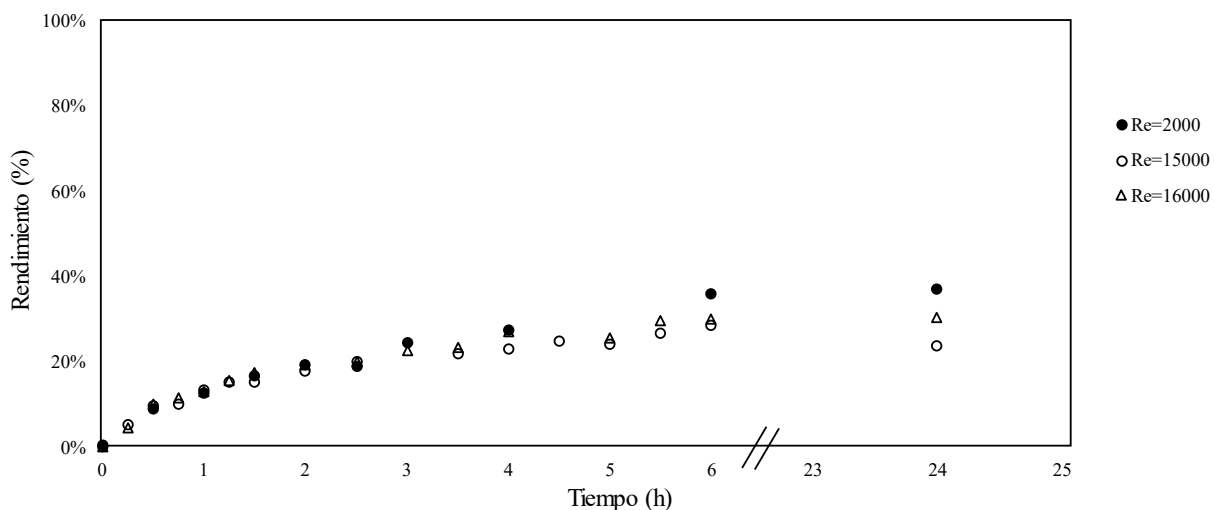


Figura 5.16. Curvas de rendimiento (%) de las sacarificaciones de papel de filtro en recirculación con distintas velocidades e intercalando el mezclador de CE como promotor de turbulencia. El gráfico presenta un salto de escala en el eje horizontal entre las 6 y las 23 h para mayor claridad.

5.3.2 Sacarificación en recirculación intercalando un dispositivo de cavitación hidrodinámica del tipo Venturi

Independientemente del resultado de la sección 5.3.1, se realizó un experimento para determinar que ocurría en el caso de realizar la sacarificación con recirculación del sólido a través del dispositivo de cavitación hidrodinámica. La **Figura 5.17** presenta los rendimientos de las sacarificaciones de papel de filtro cuando se realiza la sacarificación en recirculación, tanto intercalando el mezclador de CE o el cavitador tipo Venturi; en ambos casos se utilizó la bomba tornillo para impulsar el movimiento de la suspensión. Para el sistema que incluye al mezclador de CE, se decidió hacer un ensayo con el agregado de surfactante como método de protección de la enzima, teniendo en cuenta los resultados obtenidos para el proceso de sacarificación de papel de filtro en batch presentados en el Capítulo 3. Se eligió el surfactante de Dow (Dowfax 63N10) dado que es el que tiene menor tendencia a formar espuma. Se encontró que en ningún caso se supera el 25% de rendimiento ni luego de las 24 h. Cuando se emplea el surfactante, se observa una leve mejora en el rendimiento, aumentando de 14 a 23%. De todas maneras, los rendimientos siguen siendo muy bajos, incluso menores que los observados para el sistema en recirculación

incorporando el mezclador de CE y empleando una bomba centrífuga de impulsor abierto. Esto podría indicar que la enzima se inactiva con mayor facilidad al circular a través de la bomba tornillo, debido probablemente a los esfuerzos de corte que hace el tornillo en las zonas cercanas a la pared, o bien a que pudiera quedar adsorbida sobre la superficie del estator, que es de nitrilo. Si bien no es posible determinar si el bajo rendimiento al realizar la sacarificación con cavitación simultánea se debe al estrés que sufre la enzima como consecuencia de las ondas de choque que se generan, o está asociado a limitaciones de la bomba tornillo (o ambos motivos), claramente el uso de cavitación simultánea con la sacarificación no resulta conveniente y es desaconsejado.

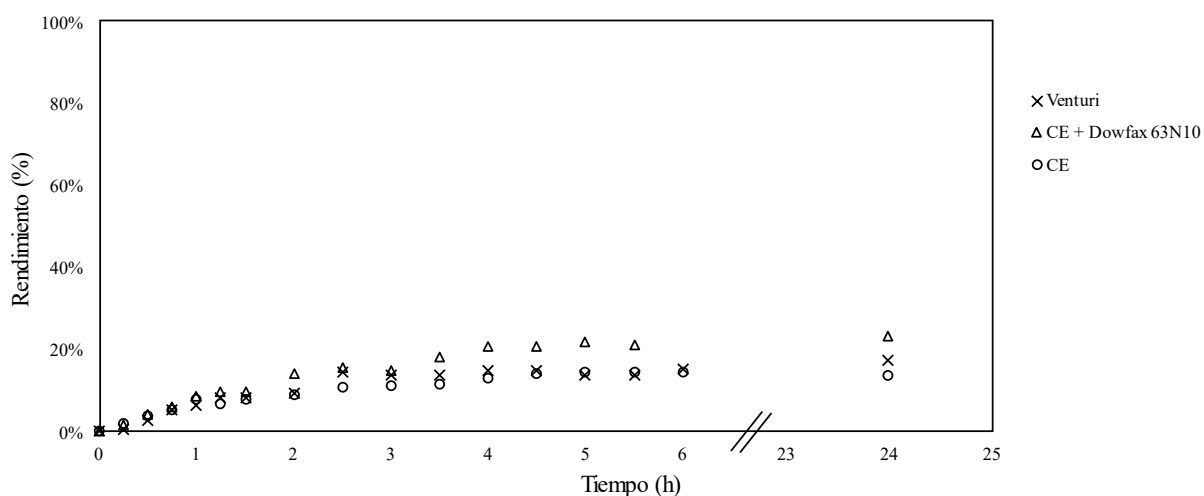


Figura 5.17. Curvas de rendimiento (%) de las sacarificaciones de papel de filtro en recirculación intercalando el mezclador de CE o el dispositivo de cavitación hidrodinámica tipo Venturi, e impulsados por la bomba tornillo. El gráfico presenta un salto de escala en el eje horizontal entre las 6 y las 23 h para mayor claridad.

Capítulo 6 : Conclusiones y perspectivas a futuro

6.1 Conclusiones principales

En esta sección se presentan de forma concisa las principales conclusiones derivadas de los resultados obtenidos en este trabajo. Dado que el objetivo central de esta tesis fue proponer y analizar estrategias para intensificar la sacarificación de residuos lignocelulósicos (RLC), abordándolo desde diversas etapas del proceso, las conclusiones se organizan según las distintas propuestas estudiadas.

6.1.1 Eficiencia de la hidrólisis ácida oxidativa sobre los RLC empleados

La hidrólisis ácida-oxidativa empleando mezclas de ácido acético y peróxido de hidrógeno (HPAC) demostró ser un pretratamiento eficaz para la remoción de lignina en los RLC estudiados, logrando en todos los casos porcentajes superiores al 68%. En el caso de los sustratos de madera, este porcentaje superó el 86%, alcanzando incluso el 100% para el caso del *Pinus sp.* Este resultado es consistente con lo reportado en la literatura, donde se destaca este método como especialmente útil para la delignificación de maderas.

Todas las maderas delignificadas mostraron un aumento en el rendimiento de glucosa durante la sacarificación enzimática en comparación con las muestras no tratadas. En las muestras crudas, los rendimientos de glucosa oscilaron entre el 1% y el 8%, lo que resalta la importancia de la eliminación de lignina previa a la sacarificación. Tras el tratamiento con HPAC, el rendimiento de glucosa se cuadruplicó en *Eucalyptus sp.*, mientras que en *Tipuana tipu* y *Pinus sp.* fue más de 15 veces superior al de las muestras sin pretratamiento, independientemente del procedimiento de lavado empleado previo a la sacarificación. Si bien no era un objetivo específico de la tesis, en función de los resultados obtenidos podemos concluir que hemos confirmado que la hidrólisis con HPAC es una estrategia efectiva para remover la lignina de residuos de madera, con el fin de someterlos posteriormente a una sacarificación enzimática.

6.1.2 Intensificación de la hidrólisis enzimática inducida por el procedimiento de lavado del sólido a sacarificar

6.1.2.1 Sustratos modelo

El lavado de papel de filtro como etapa previa a la hidrólisis enzimática resultó mejorar los rendimientos de glucosa en todos los casos, sugiriendo que los procedimientos de lavado tienen

efecto sobre la morfología de las fibras de celulosa. Las muestras que fueron lavadas con procedimientos que promueven la turbulencia conducen a fibras con una superficie más rugosa, y una matriz más abierta que aquellas que fueron lavadas por inmersión. Esto facilita la entrada y adsorción de la enzima, lo que probablemente explica la mayor eficiencia de las sacarificaciones. En el caso de las muestras que fueron sometidas a HC, los rendimientos de glucosa fueron levemente mayores para aquellas a las que se les agregó H_2O_2 , encontrándose en las microscopías SEM fibras más adelgazadas que en los otros procedimientos. Sin embargo, los mayores rendimientos se observaron para las muestras lavadas en recirculación intercalando el mezclador de CE como promotor de turbulencia, alcanzando casi un 100%. Esto último sugiere que la disgregación física, sin oxidación, es más eficiente para el caso de un sustrato que puede considerarse celulosa pura. Es posible que la oxidación parcial de los grupos oxhidrilos de la celulosa pura, la cual podría ser inducida por la HC, no permita lograr el 100% de rendimiento. En consecuencia, para el caso de matrices de celulosa pura, sería suficiente emplear un promotor de turbulencia como un mezclador de CE durante el procedimiento de lavado, siendo no sólo más eficiente sino también más económico que emplear lavados intensificados con HC que implican mayor pérdida de carga y por lo tanto mayores costos energéticos.

La sacarificación de una solución 0,05% de CMC no se vio afectada por el empleo de HC. La velocidad inicial de reacción en este caso es alta y se alcanza rápidamente el rendimiento final. Esto puede deberse a que la CMC se solubiliza completamente y tiene una estructura ramificada, lo que la hace más accesible para la enzima. Sin embargo, el rendimiento es menor al que se alcanza en el caso del papel de filtro, ya que los grupos carboxílicos que presenta no son atacados por la enzima y podrían incluso interferir con su actividad.

6.1.2.2 Residuos lignocelulósicos

Los RLC delignificados con HPAC que lograron mayores rendimientos de glucosa en la sacarificación fueron aquellos sometidos a un lavado intensificado con HC. Para estos sustratos, el efecto de la HC en la estructura y morfología de la matriz varía según la especie vegetal. Para las especies *Eucalyptus sp.* y *Tipuana tipu* (latifoliadas) la matriz resultante del pretratamiento se observa más abierta que la original, mientras que en el caso del *Pinus sp.* (conífera), conserva su estructura mostrando mayor estabilidad. Esto es consistente con los resultados de las hidrólisis enzimáticas, siendo el *Pinus sp.* la especie que conduce al menor rendimiento de glucosa.

El índice de cristalinidad de los RLC disminuye cuando se utiliza HC durante el proceso de lavado, lo que indicaría que aumenta la cantidad de celulosa amorfa disponible para la sacarificación. Sin embargo, los aumentos observados en los rendimientos de glucosa son significativos e indican la acción de varios factores. Además, el papel de filtro es el sustrato con el mayor índice de cristalinidad (superior al 80%), y aun así los rendimientos de glucosa en su sacarificación fueron siempre elevados. Esto evidencia que el cóctel Cellic CTec3 puede hidrolizar eficientemente el sustrato independientemente de su grado de cristalinidad.

El *Eucalyptus sp.* delignificado que fue lavado con promoción de la turbulencia generada por el mezclador de CE, no presentó mejoras en los rendimientos enzimáticos, a diferencia de lo ocurrido con el *Eucalyptus sp.* cavitado. Si bien las microscopías muestran fibras más desordenadas en comparación con otros procedimientos de lavado, su superficie es menos rugosa que la del *Eucalyptus sp.* lavado con HC. Esto podría explicar las diferencias en los rendimientos de glucosa obtenidos en la sacarificación. En este caso, la cavitación hidrodinámica se presenta como la opción más adecuada, ya que no sólo favorece la disgregación de las fibras de celulosa de la matriz, sino que también elimina compuestos tóxicos remanentes de la etapa de delignificación. Su capacidad oxidante resulta especialmente útil para eliminar estos compuestos, que podrían inhibir la acción enzimática de las celulasas. En contraste, el mezclador estático de CE no posee esta capacidad de remoción, y sus efectos en el lavado son comparables a los del método tradicional de inmersión con agitación.

El procedimiento de lavado intensificado por HC se aplicó a muestras de *Eucalyptus sp.* delignificado para evaluar el efecto del número de pasos por el dispositivo de cavitación y la influencia de hacer circular el sólido a través de éste. Cuando el sólido se mantiene como un lecho fijo aguas abajo del cavitador tipo Venturi, el rendimiento de glucosa aumentó con el número de pasos hasta alcanzar 50, sin mejoras adicionales al superar este número. Por el contrario, el rendimiento de glucosa obtenido cuando se fuerza la recirculación de sólidos se mantuvo prácticamente constante independientemente del número de pasos, e incluso se observó una ligera disminución al aumentar la cantidad de pasos. No se observaron mejoras significativas al hacer circular el sólido a través del tubo Venturi en comparación con mantenerlo en un lecho fijo. Además, al circular a través del tubo Venturi, el sólido se convirtió en una pulpa difícil de manipular, lo que representa una desventaja operativa. En conclusión, para este sustrato, se

recomienda usar HC en la etapa de lavado disponiendo el sólido como un lecho fijo posterior al dispositivo de cavitación, y utilizar un número de pasos optimizado para equilibrar rendimiento y consumo energético.

Para poder circular a través del tubo Venturi sin producir la obstrucción del mismo, el *Eucalyptus* *sp.* debió ser molido más finamente que cuando se lo mantuvo como un lecho fijo aguas abajo del cavitador. Dado que no se observaron diferencias significativas en los rendimientos de sacarificación, la granulometría del sólido no parece ser una limitación relevante dentro de los rangos de molienda estudiados. Por lo tanto, no sería necesario alcanzar una molienda sumamente fina para obtener buenos rendimientos en la hidrólisis enzimática, lo cual reduciría los costos asociados a la misma.

6.1.3 Hidrólisis enzimática

6.1.3.1 Condiciones generales de operación

Las enzimas celulasas suelen trabajar en un rango de pH óptimo que se encuentra entre 4,75 y 5, razón por la cual la sacarificación suele llevarse a cabo en un medio que contiene un buffer regulador de acetato/ácido acético. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que es posible obviar el uso de la solución reguladora de pH para las relaciones sólido/líquido y los sustratos examinados, siendo suficiente con ajustar el pH al óptimo indicado para el coctel enzimático al comienzo de la sacarificación. Esto reduce el uso de reactivos y, en consecuencia, los costos del proceso.

Por otro lado, se comprobó que una agitación orbital durante la sacarificación resulta más favorable que no agitar, pudiendo mejorar el contacto entre la enzima y el sustrato. Además, el área de la interfase líquido/gas no pareciera influir en la eficiencia de la sacarificación.

6.1.3.2 Uso de surfactantes no iónicos durante la hidrólisis enzimática

El agregado de surfactantes no iónicos durante la sacarificación del papel de filtro resultó en un aumento de los rendimientos de glucosa para todos los surfactantes evaluados. Este efecto beneficioso podría atribuirse a una mejor dispersión y separación de las fibras de celulosa que forman el papel, lo que facilita su degradación enzimática. En contraste, el incremento en la producción de glucosa fue considerablemente menor cuando se añadieron surfactantes no iónicos en la sacarificación de CMC. En el caso de la CMC, como se disuelve totalmente hasta generar una solución homogénea, no hay problemas de morfología de las fibras que ocasionen un

inconveniente al contacto enzima-sustrato, por lo cual cualquier mejora del agregado de surfactante no estaría relacionada con mejoras en la dispersión de las fibras. Esto sugiere una influencia de la estructura de la CMC, que es más entrecruzada que en el caso de la celulosa, y contiene grupos carboxílicos. La presencia de estos grupos en la estructura puede interferir con la adsorción de la enzima y disminuir su actividad, y no permitir que se alcance un 100% de rendimiento. La interacción de estos grupos funcionales con el surfactante mejoraría la actividad de la celulasa, dado que se observó un mayor rendimiento al utilizarlos. También debe considerarse que, al disolverse en el medio, la CMC se disocia y adquiere carga, lo que podría interferir en la adsorción de la enzima.

En el caso de las hojas de *Platanus acerifolia* y del aserrín de *Eucalyptus sp.*, la adición de surfactantes tuvo un impacto mínimo o incluso negativo en el rendimiento de glucosa y en la velocidad inicial de la sacarificación, tanto en la biomasa cruda como en la delignificada. La falta de reacción de los RLC sin pretratamiento podría explicarse porque la celulosa está ocluida en la matriz vegetal, ya que la lignina cubre y protege estas estructuras en las plantas, impidiendo el acceso de la enzima al sustrato. Aunque ciertos surfactantes no iónicos, como el Tween 80, pueden solubilizar la lignina, el hecho de que esté soluble no evita que inhiba a la enzima, dificultando en consecuencia la hidrólisis de la celulosa.

En el caso de las hojas de plátano delignificadas, el agregado de surfactantes no tuvo un efecto significativo. Cabe mencionar que el pretratamiento con HPAC no resultó ser tan eficiente para este sustrato, quedando un remanente de lignina del 14% en el sólido, lo que dificulta considerablemente su sacarificación. El agregado de surfactantes tampoco se tradujo en una mejora en la eficiencia de la sacarificación de muestras de *Eucalyptus sp.*; por el contrario, presentó un efecto levemente negativo. Como consecuencia de la hidrólisis ácida-oxidativa con HPAC previa, la muestra de *Eucalyptus sp.* pareciera presentar una matriz accesible y el agregado de surfactantes no iónicos no ocasionaría una mayor apertura. Por lo tanto, el uso de surfactantes para optimizar la hidrólisis enzimática debe evaluarse en cada caso particular, considerando su costo y el hecho de que no siempre genera una mejora significativa en la eficiencia de la sacarificación. Además, la cantidad requerida puede ser considerable y permanece en solución, por lo que también sería importante analizar su impacto en la fermentación posterior que hará uso de la glucosa obtenida como sustrato base de carbono.

6.1.3.3 Hidrólisis enzimática en recirculación

La sacarificación de papel de filtro en recirculación no resultó ser una buena alternativa. Tanto en la circulación a través del mezclador de CE como en el cavitador tipo Venturi, los rendimientos de glucosa fueron significativamente más bajos que en las sacarificaciones en batch. Los mayores rendimientos con el mezclador de CE se obtuvieron a bajas velocidades de circulación ($Re=2.000$), lo que sugiere que el principal factor limitante es el estrés hidrodinámico que afecta a la enzima.

Para el caso del cavitador tipo Venturi, los rendimientos fueron siempre bajos, muy inferiores a los obtenidos en batch. Aunque no es posible determinar si el bajo rendimiento de la sacarificación con cavitación simultánea se debe al estrés hidrodinámico sobre la enzima, causado por las ondas de choque generadas, a las limitaciones asociadas al material de la bomba tornillo o a una combinación de ambos factores, queda claro que este método no es conveniente y su uso es desaconsejable.

6.2 Perspectivas a futuro

A continuación, se enumeran algunas propuestas de actividades a futuro que resultaría interesante abordar teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis.

- Considerando que el *Pinus sp.* es la especie de estructura más estable de las estudiadas, sería interesante realizar el lavado intensificado por HC con circulación del sólido a través del dispositivo de cavitación, a fin de observar si forzar a este material a través del dispositivo de cavitación logra desestabilizar su estructura.
- Se propone analizar los resultados de sacarificación considerando diversos modelos cinéticos que se hayan propuesto en literatura, y evaluar cómo se modifican los parámetros relacionados con la morfología de las fibras de las muestras que fueron sometidas a cavitación hidrodinámica. Asimismo, analizar la posibilidad de incorporar esta información en alguno de los modelos.
- Como una propuesta a futuro, que involucra mayor análisis, se propone evaluar la posibilidad de reutilizar el licor de HPAC para sucesivas delignificaciones. Esto permitiría reducir el uso de reactivos. Además, el licor obtenido estará más concentrado en lignina lo que podría facilitar su recuperación como subproducto.

- Continuar explorando aplicaciones en otros procesos del prototipo de mezclador de CE diseñado. En particular, una propuesta relacionada con el plan de beca postdoctoral que abordaremos prevé el uso de este equipo para promover el mezclado de efluentes textiles con radicales libres formados previamente en un reactor de lecho fijo en el cual se realiza el proceso tipo Fenton heterogéneo, pero circulando solo peróxido de hidrógeno. De esta manera, el efluente no circula por el reactor de lecho fijo, evitando la desactivación de los catalizadores por adsorción de los compuestos orgánicos presentes en el agua residual. Además, esta estrategia permitiría contactar los radicales hidroxilo formados, incluso con algo de hierro proveniente del leaching del catalizador, sin tener que agregar una concentración alta de hierro que termine en un barro Fenton al neutralizar el efluente tratado.
- Como otra propuesta a futuro que involucra mayor análisis, se podría continuar explorando otras aplicaciones del prototipo de mezclador de CE diseñado y de los sistemas de HC, orientado a promover la extracción de compuestos bioactivos a partir de residuos alimentarios u otros residuos forestales, como hojas de olivo o frutos regionales.

6.3 Producciones

6.3.1 Publicaciones

Balbi, M. D. P., Fleite, S., Gonzalez Giqueax, C., Cassanello, M. (2025 – *en desarrollo*). Enzymatic saccharification of delignified biomass intensified by hydrodynamic cavitation

Balbi, M. D. P., Fleite, S., & Cassanello, M. (2024). CFD-aided contraction-expansion static mixer design for oil-in-water emulsification. *Chemical Product and Process Modeling*, 19(2), 275-284.

Balbi, M. D. P., Fleite, S., Kildegaard, G., & Cassanello, M. (2023). Cellulose Enzymatic Saccharification Intensified by Nonionic Surfactants. *Industrial & Engineering Chemistry Research*.

6.3.2 Participaciones en eventos científicos

Balbi, M. P., Kildegaard, G., Fleite, S.N., Cassanello, M.C. Improving saccharification of cellulosic and lignocellulosic residues. WCCE11 – 11th World Congress of Chemical Engineering, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Junio 2023.

Balbi, M. P., Fleite, S.N., Cassanello, M.C. CFD-aided contraction-expansion static mixer design and operation. WCCE11 – 11th World Congress of Chemical Engineering, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Junio 2023.

G. Kildegaard, P. Balbi, G. Salierno, C. De Blasio, M. Cassanello, M. Galvagno. A Cleaner Conversion of Urban Waste Biomass for Second Generation Ethanol Production. 8th International Conference on Engineering for Waste and Biomass Valorisation, WasteEng 2020, May31-June 4, 2021, online mode.

Kildegaard, G., Balbi, M. P., Salierno, G., Cassanello, M., Galvagno, M. Urban Forest Leaf Litter Waste Delignification Optimized by Experimental Design. 2nd Latin American Conference on Sustainable Development of Energy, Water and Environmental Systems (SDEWES 2020). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires, 9-12 de febrero 2020.

Referencias

Abolore, R. S., Swarna Jaiswal, Amit K. Jaiswal, Green and sustainable pretreatment methods for cellulose extraction from lignocellulosic biomass and its applications: A review, *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 7, 2024, 100396. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100396>

Adsul, M., Sandhu, S. K., Singhania, R. R., Gupta, R., Puri, S. K., & Mathur, A. (2020). Designing a cellulolytic enzyme cocktail for the efficient and economical conversion of lignocellulosic biomass to biofuels. *Enzyme and microbial technology*, 133, 109442. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109442>

Aditiya, H.B.; Mahlia, T.M.I.; Chong, W.T.; Nur, H.; Sebayang, A.H. Second Generation Bioethanol Production: A Critical Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016, 66, 631–653. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>

Agarkoti, C., Gogate, P. R., Pandit, A. B., Comparison of acoustic and hydrodynamic cavitation based hybrid AOPs for COD reduction of commercial effluent from CETP, *Journal of Environmental Management*, 281, 2021a, 111792. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111792>

Agarkoti, C., Thanekar, P.D., Gogate, P.R., Cavitation based treatment of industrial wastewater: A critical review focusing on mechanisms, design aspects, operating conditions and application to real effluents, *Journal of Environmental Management*, 300, 2021b, 113786. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113786>

Ahmed, I.N.; Yang, X.-L.; Dubale, A.A.; Shao, R.; Guan, R.-F.; Meng, X.; Xie, M.-H. Zirconium Based Metal-Organic Framework in-Situ Assisted Hydrothermal Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Platanus X Acerifolia Exfoliating Bark for Bioethanol Production. *Bioresource Technology*. 2019, 280, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.041>

Alekseev, K. A., & Mukhametzyanova, A. G. (2020). Classification, function, and construction of modern static mixers. *Chemical and Petroleum Engineering*, 55(11), 934-942. <https://doi.org/10.1007/s10556-020-00716-9>

Alves-Ferreira, J.; Lourenço, A.; Morgado, F.; Duarte, L.C.; Roseiro, L.B.; Fernandes, M.C.; Pereira, H.; Carneiro, F. Delignification of Cistus Ladanifer Biomass by Organosolv and Alkali Processes. *Energies* 2021, 14, 1127. <https://doi.org/10.3390/en14041127>

Arevalo-Gallegos, A., Ahmad, Z., Asgher, M., Parra-Saldivar, R., & Iqbal, H. M. (2017). Lignocellulose: a sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach—a review. *International journal of biological macromolecules*, 99, 308-318. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.097>

Ascencio, J.J.; Magalhães, L.S.; Ferreira, F.B.; Heinz, O.; Ferraz, A.; Chandel, A.K. Surfactant-Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Eucalyptus Kraft Pulp: The Interrelationship Between Lignin Reduction and Sugar Recovery. *Catalysts* 2025, 15, 47. <https://doi.org/10.3390/catal15010047>

Badve, M., Gogate, P., Pandit, A., & Csoka, L. (2013). Hydrodynamic cavitation as a novel approach for wastewater treatment in wood finishing industry. *Separation and purification technology*, 106, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.12.029>

Bagal, M. V., & Gogate, P. R. (2014). Wastewater treatment using hybrid treatment schemes based on cavitation and Fenton chemistry: a review. *Ultrasonics sonochemistry*, 21(1), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.07.009>

Baksi, S., Ujjaini Sarkar, Raffaella Villa, Debajyoti Basu, Deblina Sengupta, Conversion of biomass to biofuels through sugar platform: A review of enzymatic hydrolysis highlighting the trade-off between product and substrate inhibitions, *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 55, 2023, 102963. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2022.102963>

Benaiges, R. ¿Cómo vive un árbol? funcionamiento general de los árboles y las plantas. Disponible en https://eforown.ctfc.cat/pdf/8a_La%20vida%20de%20los%20arboles.%20Funcion%20de%20nutricion_IHJ.pdf. Consultado por última vez el 16/02/2025.

Berg, L. R. (1997). Introductory botany: plants, people, and the environment. Editorial Cengage Learning.

Bueno Moron, J., van Klink, G. P., & Gruter, G. J. M. (2025). Lignocellulose saccharification: historical insights and recent industrial advancements towards 2nd generation sugars. *RSC Sustainability*. <https://doi.org/10.1039/D4SU00600C>

Cazier, E.A., Thanh-Nhat Pham, Louis Cossus, Maher Abla, Tina Ilc, Philip Lawrence, Exploring industrial lignocellulosic waste: Sources, types, and potential as high-value molecules, *Waste Management*, 188, 2024, 11-38. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2024.07.029>

Cavatorta, O. N., Böhm, U., & de del Giorgio, A. M. C. (1999). Fluid-dynamic and mass-transfer behavior of static mixers and regular packings. *AIChE journal*, 45(5), 938-948. <https://doi.org/10.1002/aic.690450504>

Chávez-Sifontes, M., & Domine, M. E. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15-46.

Chen, X., Yang, V. (2014) Thickness-based adaptive mesh refinement methods for multi-phase flow simulations with thin regions, *Journal of Computational Physics*, 269, 22–39 <https://doi.org/10.1016/j.jcp.2014.02.035>

Chen, Y. A.; Zhou, Y.; Qin, Y.; Liu, D.; Zhao, X. Evaluation of the action of Tween 20 non-ionic surfactant during enzymatic hydrolysis of lignocellulose: Pretreatment, hydrolysis conditions and lignin structure. *Bioresource Technology*. **2018**, 269, 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.119>

Climent, E., & Magnaudet, J. (2006). Dynamics of a two-dimensional upflowing mixing layer seeded with bubbles: Bubble dispersion and effect of two-way coupling. *Physics of Fluids*, 18(10). <https://doi.org/10.1063/1.2363968>

Cong, Y., Zhang, W., Liu, C. Huang, F. (2020) Composition and Oil-Water Interfacial Tension Studies in Different Vegetable Oils. *Food Biophysics*, 15, 229–239 <https://doi.org/10.1007/s11483-019-09617-8>

Davidson, R. S., Choudhury, H., Origgi, S., Castellan, A., Trichet, V., & Capretti, G. (1995). The reaction of phloroglucinol in the presence of acid with lignin-containing materials. *Journal of*

Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 91(1), 87-93. [https://doi.org/10.1016/1010-6030\(95\)04101-K](https://doi.org/10.1016/1010-6030(95)04101-K)

Deb, T. K., Lebaz, N., Ozdemir, M. S., Govoreanu, R., Mhamdi, A., Sin, G., Sheibat-Othman, N., (2022) Monitoring and Modeling of Creaming in Oil-in-Water Emulsions, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 61, 4638–4647 <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.1c04722>

Devi, K. B., Malakar, R., Kumar, A., Sarma, N., & Jha, D. K. (2023). Ecofriendly utilization of lignocellulosic wastes: mushroom cultivation and value addition. In *Value-addition in agri-food industry waste through enzyme technology* (pp. 237-254). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89928-4.00016-X>

da Costa Nogueira, C.; de Araújo Padilha, C. E.; Ferreira de Souza Filho, P.; dos Santos, E. S. Effects of the Addition of Poly(ethylene Glycol) and Non-ionic Surfactants on Pretreatment, Enzymatic Hydrolysis, and Ethanol Fermentation. *BioEnergy Research*. **2022**, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10388-9>

de Oliveira, D. R., Matos, M., Silva, K. T., Mazzetto, S. E., Magalhães, W. L., Lomonaco, D., & Avelino, F. (2025). Unveiling the mechanistic aspects of different delignification methods and their effects on the structure of technical Eucalyptus lignins. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s13399-025-06502-y>

Dijkink, R., & Ohl, C. D. (2008). Measurement of cavitation induced wall shear stress. *Applied physics letters*, 93(25). <https://doi.org/10.1063/1.3046735>

Eades, P.; Kusch-Brandt, S.; Heaven, S.; Banks, C.J. Estimating the Generation of GardenWaste in England and the Differences between Rural and Urban Areas. *Resources* 2020, 9, 8. <https://doi.org/10.3390/resources9010008>

Fleite. S. N. (2021) *Desarrollo de sistemas de tratamiento para efluentes de producciones ganaderas intensivas a corral (feedlots)* PhD Thesis, Universidad de Buenos Aires. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n6846_Fleite.pdf

Fleite, S. N., Ayude, M. A., Ranade, V. V., & Cassanello, M. C. (2024). Hydrodynamic cavitation effects on advanced oxidation processes and mass transfer: A conceptual model. *Chemical Engineering Journal Advances*, 18, 100603. <https://doi.org/10.1016/j.ceja.2024.100603>

Fleite, S. N., García, A. R., de los Santos, C., de Iorio, A. F., Cassanello, M., (2020a) Static mixer continuous chemical coagulation-flocculation for cattle feedlot wastewater treatment, *Desalination and Water Treatment*, 189, 98–107 <https://doi.org/10.5004/dwt.2020.25600>

Fleite, S. N., García, A. R., de los Santos, C., Missoni, L. L., Torres, R., Lagorio, M. G., Cassanello, M., (2020b) Simulation and optimization of a lamella settler for cattle feedlot wastewater treatment and nutrients recovery. Experimental validation in the field, *Heliyon*, 6, e05840, 1–12. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05840.

Fuster, D., Bagué, A., Boeck, T., Le Moyne, L., Leboissetier, A., Popinet, S., Ray, P., Scardovelli, R., Zaleski, S. (2009). Simulation of primary atomization with an octree adaptive mesh refinement and VOF method. *International Journal of Multiphase Flow*, 35, 550–565 <https://doi.org/10.1016/j.ijmultiphaseflow.2009.02.014>

Gągól, M., Przyjazny, A., & Boczka, G. (2018). Wastewater treatment by means of advanced oxidation processes based on cavitation—a review. *Chemical Engineering Journal*, 338, 599–627. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.049>

Ghanem, A., Lemenand, T., Della Valle, D., & Peerhossaini, H. (2014). Static mixers: Mechanisms, applications, and characterization methods—A review. *Chemical engineering research and design*, 92(2), 205–228. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.07.013>

Giménez, A. M., Moglia, J. G., Hernández, P. & Gerez, R. (2005). Anatomía de madera. Universidad Nacional de Santiago del Estero, Facultad de Ciencias Forestales, Cátedra de Dendrología y Xilología.

Gogate, P. R., in *Alternative Energy Sources for Green Chemistry*, ed. G. Stefanidis and A. Stankiewicz, *The Royal Society of Chemistry*, 2016, pp. 126–160.

Guo, H., Chang, Y., Lee, D.-J., Review: Enzymatic saccharification of lignocellulosic biorefinery: Research focuses, *Bioresource Technology*, 252 (2018) 198–215. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.062>

Hamidi, R., Damizia, M., De Filippis, P., Patrizi, D., Verdone, N., Vilardi, G., de Caprariis, B., Recent developments and future outlooks of hydrodynamic cavitation as an intensification technology for renewable biofuels production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11 (2023) 110819, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110819>

Håkansson, A. (2019) Emulsion Formation by Homogenization: Current Understanding and Future Perspectives, *Annual Review of Food Science and Technology*, 10, 239–58. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121501>

Hassan, S.S.; Williams, G.A.; Jaiswal, A.K. Emerging Technologies for the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *Bioresource Technology*, 2018, 262, 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.099>

Hoang, V. T., Lim, J., Byon, C., Park, J. M., 2018, Three-dimensional simulation of droplet dynamics in planar contraction microchannel, *Chemical Engineering Science*, 176, 59–65 <https://doi.org/10.1016/j.ces.2017.10.020>

Holkar, C. R., Jadhav, A. J., Pinjari, D. V., & Pandit, A. B. (2019). Cavitationally driven transformations: A technique of process intensification. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 58(15), 5797–5819. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.8b04524>

Hsieh, C. W. C.; Cannella, D.; Jørgensen, H.; Felby, C.; Thygesen, L. G. Cellobiohydrolase and endoglucanase respond differently to surfactants during the hydrolysis of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*. **2015**, 8, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0242-y>

Hou, F., Fan, L., Ma, X., Wang, D., Wang, W., Ding, T., ... & Liu, D. (2018). Degradation of carboxymethylcellulose using ultrasound and β -glucanase: Pathways, kinetics and hydrolysates' properties. *Carbohydrate polymers*, 201, 514–521. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.092>

Javier-Astete, R., Jimenez-Davalos, J., & Zolla, G. (2021). Determination of hemicellulose, cellulose, holocellulose and lignin content using FTIR in *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) K.

Schum. and Guazuma crinita Lam. *PLoS One*, 16(10), e0256559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256559>

Jegatheeswaran, S., Ein-Mozaffari, F., Wu, J., 2020, Laminar mixing of non-Newtonian fluids in static mixers: process intensification perspective, *Rev. Chem. Eng.*, 36, 423–436. <https://doi.org/10.1515/revce-2017-0104>

Jimenez-Gutierrez, J.M.; Verlinden, R.A.J.; van der Meer, P.C.; van der Wielen, L.A.M.; Straathof, A.J.J. Liquid Hot Water Pretreatment of Lignocellulosic Biomass at Lab and Pilot Scale. *Processes* 2021, 9, 1518. <https://doi.org/10.3390/pr9091518>

Jönsson, L.J.; Alriksson, B.; Nilvebrant, N.-O. Bioconversion of Lignocellulose: Inhibitors and Detoxification. *Biotechnol. Biofuels* 2013, 6, 16. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>

Kininge, M. M., & Gogate, P. R. (2022). Intensification of alkaline delignification of sugarcane bagasse using ultrasound assisted approach. *Ultrasonics Sonochemistry*, 82, 105870. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105870>

Kostryukov, S. G., Matyakubov, H. B., Masterova, Y. Y., Kozlov, A. S., Pryanichnikova, M. K., Pynenkov, A. A., & Khluchina, N. A. (2023). Determination of lignin, cellulose, and hemicellulose in plant materials by FTIR spectroscopy. *Journal of Analytical Chemistry*, 78(6), 718-727. <https://doi.org/10.31857/S0044450223040102>

Kuznetsov, B. N., Kuznetsova, S. A., Danilov, V. G., Kozlov, I. A., Taraban'ko, V. E., Ivanchenko, N. M., & Alexandrova, N. B. (2002). New catalytic processes for a sustainable chemistry of cellulose production from wood biomass. *Catalysis Today*, 75(1-4), 211-217. [https://doi.org/10.1016/S0920-5861\(02\)00071-8](https://doi.org/10.1016/S0920-5861(02)00071-8)

Lagrée, P.-Y., Staron, L., Popinet, S., (2011) The granular column collapse as a continuum: validity of a two-dimensional Navier-Stokes model with a $\{\mu\}$ (I)-rheology, *J. Fluid Mechanics*, 686, 378–408. <https://doi.org/10.1017/jfm.2011.335>

Lakshmi, N.J., C. Agarkoti, Parag R. Gogate, Aniruddha B. Pandit, Acoustic and hydrodynamic cavitation-based combined treatment techniques for the treatment of industrial real effluent

containing mainly pharmaceutical compounds, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10, 5, 2022, 108349. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108349>

Lebaz, N., Touma, K., Sheibat-Othman, N., 2023, An original continuous process for double emulsions preparation using static mixers: Focus on the viscosity, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 674, 131984, 1–9 <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2023.131984>

Lebaz, N., Azizi, F., Sheibat-Othman, N., 2022a, Modeling Droplet Breakage in Continuous Emulsification Using Static Mixers in the Framework of the Entire Spectrum of Turbulent Energy, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 61, 541–553 <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.1c03529>

Lebaz, N., Sheibat-Othman, N., 2022b, Population balance modelling of a continuous static mixer-based emulsification process, *Chemical Engineering Research and Design*, 188, 645–654 <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2022.10.022>

Lee, C.S.; Conradie, A.V.; Lester, E. Review of Supercritical Water Gasification with Lignocellulosic Real Biomass as the Feedstocks: Process Parameters, Biomass Composition, Catalyst Development, Reactor Design and Its Challenges. *Chemical Engineering. J.* 2021, 415, 128837. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.128837>

Li, X., Wang, Y., Tang, W., Fan, B., He, Y.-C., Ma, C., Co-production of reducing sugars and xylo-oligosaccharides from rape straw through sodium dodecyl sulfate-mediated p-toluenesulfonic acid pretreatment, *Industrial Crops and Products*, 222, 2024, 119888. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119888>.

Li, Y.; Sun, Z.; Ge, X.; Zhang, J. Effects of lignin and surfactant on adsorption and hydrolysis of cellulases on cellulose. *Biotechnology for Biofuels*. **2016**, 9, 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0434-0>

Limayem, A., & Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in energy and combustion science*, 38(4), 449-467. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>

Lindorfer, J., Lettner, M., Hesser, F., Fazeni, K., Rosenfield, D., Annevelink, B., & Mandl, M. (2019). Technical, economic and environmental assessment of biorefinery concepts: Developing a practical approach for characterisation. In *IEA bioenergy task* (Vol. 42).

Lin, S. Y., & Dence, C. W. (Eds.). (2012). *Methods in lignin chemistry*. Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-74065-7>

Liu, Y., Ding, Y., Li, Y., Wang, X., Sun, Y., & Chen, C. (2024). A comprehensive review of recent advances in delignification technology. *The Journal of The Textile Institute*, 115(12), 2489-2504. <https://doi.org/10.1080/00405000.2023.2296691>

Liu, Q., Meysam Madadi, Salauddin Al Azad, Xingmei Lu, Hong Yan, Qing Zhou, Chihe Sun, Fubao Sun, Unveiling the mechanisms of mixed surfactant synergy in passivating lignin-cellulase interactions during lignocellulosic saccharification, *Journal of Colloid and Interface Science*, 681, 2025, 404-415. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2024.11.188>

López-Gómez, J.P.; Pérez-Rivero, C.; Venus, J. Valorisation of Solid Biowastes: The Lactic Acid Alternative. *Process Biochemistry*. 2020, 99, 222–235. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.08.029>

Lou, H.; Zeng, M.; Hu, Q.; Cai, C.; Lin, X.; Qiu, X.; Yang, D.; Pang, Y. Nonionic surfactants enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by reducing cellulase deactivation caused by shear force and air-liquid interface, *Bioresource Technology*. 2018, 249, p.1–8. L. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.066>

Lü, Y., Zhu, S., Wang, K., & Luo, G. (2016). Simulation of the mixing process in a straight tube with sudden changed cross-section. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 24(6), 711–718. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2016.01.011>

Lv, Y.; Chen, Z.; Wang, H.; Xiao, Y.; Ling, R.; Gong, M.; Wei, W. Enhancement of glucose production from sugarcane bagasse through an HCl-catalyzed ethylene glycol pretreatment and Tween 80. *Renewable Energy*, 2022, 194, 495-503. DOI: [10.1016/j.cjche.2016.01.011](https://doi.org/10.1016/j.cjche.2016.01.011)

Maceda, A., Soto-Hernández, M., Peña-Valdivia, C. B., Trejo, C., & Terrazas, T. (2021). Lignina: composición, síntesis y evolución. *Madera y bosques*, 27(2). <https://doi.org/10.21829/myb.2021.2722137>

MacFarlane, D. W. (2009). Potential availability of urban wood biomass in Michigan: Implications for energy production, carbon sequestration and sustainable forest management in the USA. *Biomass and Bioenergy*, 33(4), 628-634. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.10.004>

Madison. M., Coward-Kelly, G., Liang, C., Nazmul Karim, M., Falls, M., Holtzapple, M., Mechanical pretreatment of biomass e Part I: Acoustic and hydrodynamic cavitation, *Biomass and Bioenergy*, 2017, 98, 135-141. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.01.007>

Meng, F., Li, N., Yang, H., Shi, Z., Zhao, P., & Yang, J. (2022). Investigation of hydrogen peroxide-acetic acid pretreatment to enhance the enzymatic digestibility of bamboo residues. *Bioresource Technology*, 344, 126162. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126162>

Mota, T.R.; Oliveira, D.M.; Morais, G.R.; Marchiosi, R.; Buckeridge, M.S.; Ferrarese-Filho, O.; dos Santos, W.D. Hydrogen Peroxide-Acetic Acid Pretreatment Increases the Saccharification and Enzyme Adsorption on Lignocellulose. *Industrial Crops and Products*. 2019, 140, 111657 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111657>

Muaaz-Us-Salam, S.; Cleall, P.J.; Harbottle, M.J. Application of Enzymatic and Bacterial Biodelignification Systems for Enhanced Breakdown of Model Lignocellulosic Wastes. *Science of The Total Environment*. 2020, 728, 138741. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138741>

Myers, K. J., Janz, E. E., Cathie, N., & Jones, M. A. (2018). Employ static mixers for process intensification. *Chem. Eng. Prog.*, 114(3), 55-63.

Nagarajan, S., Ranade, V.V., Pretreatment of milled and unchopped sugarcane bagasse with vortex based hydrodynamic cavitation for enhanced biogas production, *Bioresource Technology* 361 (2022) 127663. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127663>

Nagarajan, S., Ranade, V.V., Pretreatment of Lignocellulosic Biomass Using Vortex-Based Devices for Cavitation: Influence on Biomethane Potential, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 2019 58 (35), 15975-15988. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b00859>

Ning, P.; Yang, G.; Hu, L.; Sun, J.; Shi, L.; Zhou, Y.; Wang, Z.; Yang, J. Recent advances in the valorization of plant biomass. *Biotechnology for Biofuels*. **2021**, *14*(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01949-3>

Ninkuu, V.; Yan, J.; Fu, Z.; Yang, T.; Ziemah, J.; Ullrich, M.S.; Kuhnert, N.; Zeng, H. Lignin and Its Pathway-Associated Phytoalexins Modulate Plant Defense against Fungi. *J. Fungi* **2023**, *9*, 52. <https://doi.org/10.3390/jof9010052>

Pallapolu, V. R., Shi, S.; Kang, L.; Kothari, U.; Li, J. Boost Effect of Water-Soluble Polymers on Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. **2020**, *59*(11), 5186–5193. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b05850>

Pavlenko, A. Numerical Modeling of the Behavior of Bubble Clusters in Cavitation Processes. *Energies* **2024**, *17*, 1741. <https://doi.org/10.3390/en17071741>

Pereira, E., Pereira, D. T. V., Rabelo, S. C., Ceriani, R., & da Costa, A. C. (2025). Green solvent pretreatments for lignocellulosic biorefineries: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 115303. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.115303>

Prado, C.A., Cunha, M.L.S., Arruda, G.L., Cruz-Santos, M.M., Antunes, F.A.F., Shibukawa, V.P., Teran-Hilares, R., da Silva, S.S., Santos, J.C., Hydrodynamic cavitation-assisted acid pretreatment and fed-batch simultaneous saccharification and co-fermentation for ethanol production from sugarcane bagasse using immobilized cells of *Scheffersomyces parashehatae*, *Bioresource Technology* **394** (2024) 130234. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.130234>

Podbevšek, D., Damien Colombet, Frederic Ayela, Gilles Ledoux, Localization and quantification of radical production in cavitating flows with luminol chemiluminescent reactions, *Ultrasonics Sonochemistry*, **71**, 2021, 105370. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105370>

Popinet, S., (2003) Gerris: a tree-based adaptive solver for the incompressible Euler equations in complex geometries, *Journal of Computational Physics*, 190(2), 572–600. [https://doi.org/10.1016/S0021-9991\(03\)00298-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9991(03)00298-5)

Popinet, S. (2009), An accurate adaptive solver for surface-tension-driven interfacial flows, *Journal of Computational Physics*, 228, 5838–5866. <https://doi.org/10.1016/j.jcp.2009.04.042>

Prado, C.A., Antunes, F.A.F., Rocha, T.M., Sanchez-Muñoz, S., Barbosa, F.G., Teran-Hilares, R., Cruz-Santos, M.M., Arruda, G.L., da Silva, S.S., Santos, J.C., A review on recent developments in hydrodynamic cavitation and advanced oxidative processes for pretreatment of lignocellulosic materials, *Bioresource Technology*, 345 (2022) 126458, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126458>

Ramirez-Cadavid, D.A., Kozyuk, O., Lyle, P., Michel Jr., F.C., Effects of hydrodynamic cavitation on dry mill corn ethanol production, *Process Biochemistry* 51 (2016) 500–508. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.01.001>

Ranade, V. V., Sarvothaman, V. P., Simpson, A., Nagarajan, S., & Group, I. (2021). Scale-up of vortex based hydrodynamic cavitation devices: A case of degradation of di-chloro aniline in water. *Ultrasonics sonochemistry*, 70, 105295. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105295>

Ray, A., Bhonsle, A. K., Singh, J., Trivedi, J., & Atray, N. (2025). Examining alternative carbon resources for sustainable energy generation: A comprehensive review. *Next Energy*, 6, 100194. <https://doi.org/10.1016/j.nxener.2024.100194>

Rocha-Martín, J.; Martínez-Bernal, C.; Pérez-Cobas, Y.; Reyes-Sosa, F. M.; Díez García, B. Additives enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 2017, 244, p.48–56. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.132>

Saharan, V. K., Badve, M. P., & Pandit, A. B. (2011). Degradation of Reactive Red 120 dye using hydrodynamic cavitation. *Chemical engineering journal*, 178, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.10.018>

Saharan, V. K., Pandit, A. B., Kumar, P. S. S., Anandan, S., Hydrodynamic Cavitation as an Advanced Oxidation Technique for the Degradation of Acid Red 88 Dye, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 2012, 51, 4, 1981–1989. <https://doi.org/10.1021/ie200249k>

Saini, J. K., Himanshu, Hemansi, Amanjot Kaur, Aayush Mathur, Strategies to enhance enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for biorefinery applications: A review, *Bioresource Technology*, 360, 2022, 127517, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127517>

Saini, J. K., Anil Kumar Patel, Mukund Adsul, Reeta Rani Singhania, Cellulase adsorption on lignin: A roadblock for economic hydrolysis of biomass, *Renewable Energy*, 98, 2016, 29-42. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.089>

Salem, K. S., Kasera, N. K., Rahman, M. A., Jameel, H., Habibi, Y., Eichhorn, S. J., French, A. D., Pal, L., Lucia, L. A. (2023). Comparison and assessment of methods for cellulose crystallinity determination. *Chemical Society Reviews*. 52, 6417–6446. <https://doi.org/10.1039/D2CS00569G>

Sánchez Muñoz, S.; Rocha Balbino, T.; Mier Alba, E.; Gonçalves Barbosa, F.; Tonet de Pier, F., Lazuroz Moura de Almeida, A.; Balan Zilla, A. H.; Fernandes Antunes, F. A.; Terán Hilares, R.; Balagurusamy, N.; dos Santos, J. C.; Silvério da Silva, S. Surfactants in biorefineries: Role, challenges & perspectives. *Bioresource Technology*, 2022, 345, 126477. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126477>

Santos, J. I., Martín-Sampedro, R., Fillat, Ú., Oliva, J. M., Negro, M. J., Ballesteros, M., Eugenio, M. E. & Ibarra, D. (2015). Evaluating lignin-rich residues from biochemical ethanol production of wheat straw and olive tree pruning by FTIR and 2D-NMR. *International Journal of Polymer Science*, 2015(1), 314891. <https://doi.org/10.1155/2015/314891>

Scala, M., Gamet, L., Malbec, L. M., & Li, H. Z. (2020). Hydrodynamics of gas-liquid dispersion in transparent Sulzer static mixers SMXTM. *Chemical Engineering Science*, 213, 115398. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2019.115398>

Schrimpf, M., Esteban, J., Rösler, T., Vorholt, A. J., & Leitner, W. (2019). Intensified reactors for gas-liquid-liquid multiphase catalysis: From chemistry to engineering. *Chemical Engineering Journal*, 372, 917-939. <https://doi.org/10.1021/acscatal.2c01972>

Segal, L. G. J. M. A., Creely, J. J., Martin Jr, A. E., & Conrad, C. M. (1959). An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile research journal*, 29(10), 786-794. DOI: 10.1177/004051755902901003

Shahidi, S., Koch, C. R., Bhattacharjee, S., Sadrzadeh, M., (2017) Dielectric behavior of oil–water emulsions during phase separation probed by electrical impedance spectroscopy, *Sensors and Actuators B* 243, 460–464. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.11.072>

Sheng, Y.; Tan, X.; Gu, Y.; Zhou, X.; Tu, M.; Xu, Y. Effect of Ascorbic Acid Assisted Dilute Acid Pretreatment on Lignin Removal and Enzyme Digestibility of Agricultural Residues. *Renewable Energy*, 2021, 163, 732–739. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.08.135>

Shi, Y., Ge, Y., Chang, J., Shao, H., & Tang, Y. (2013). Garden waste biomass for renewable and sustainable energy production in China: Potential, challenges and development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 22, 432-437. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.02.003>

Simpson, A., Ranade, V. V., 110th Anniversary: Comparison of Cavitation Devices Based on Linear and Swirling Flows: Hydrodynamic Characteristics, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2019 58 (31), 14488-14509. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b02757>

Singhanian, R. R., Dixit, P., Patel, A. K., Giri, B. S., Kuo, C. H., Chen, C. W., & Di Dong, C. (2021). Role and significance of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) in lignocellulose deconstruction. *Bioresource Technology*, 335, 125261. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125261>

Song, Y.; Cho, E.J.; Park, C.S.; Oh, C.H.; Park, B.-J.; Bae, H.-J. A Strategy for Sequential Fermentation by *Saccharomyces Cerevisiae* and *Pichia Stipitis* in Bioethanol Production from Hardwoods. *Renewable Energy*, 2019, 139, 1281–1289. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.032>

Srivastava, N., Rathour, R., Jha, S., Pandey, K., Srivastava, M., Thakur, V.K., Sengar, R.S., Gupta, V.K., Mazumder, P.B., Khan, A.F., Mishra, P.K., Review: Microbial Beta Glucosidase Enzymes: Recent Advances in Biomass Conversion for Biofuels Application, *Biomolecules*, 2019, 9, 220. <https://doi.org/10.3390/biom9060220>

- Su, K., Wu, J., Xia, D., Classification of regimes determining ultrasonic cavitation erosion in solid particle suspensions, *Ultrasonics – Sonochemistry*, 68 (2020) 105214. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105214>
- Sulis, D. B., Lavoine, N., Sederoff, H., Jiang, X., Marques, B. M., Lan, K., Cofre-Vega, C, Barrangou, R & Wang, J. P. (2025). Advances in lignocellulosic feedstocks for bioenergy and bioproducts. *Nature Communications*, 16(1), 1244. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-56472-y>
- Sun, C., Meng, X., Sun, F., Zhang, J., Tu, M., Chang, J. S., Reungsang, A, Xia, & A Ragauskas, A. J. (2023). Advances and perspectives on mass transfer and enzymatic hydrolysis in the enzyme-mediated lignocellulosic biorefinery: a review. *Biotechnology Advances*, 62, 108059. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108059>
- Sun, D.; Yang, Q.; Wang, Y.; Gao, H.; He, M.; Lin, X.; Lu, J.; Wang, Y.; Kang, H.; Alam, A.; Tu, Y.; Xia, T.; Peng, L. Distinct mechanisms of enzymatic saccharification and bioethanol conversion enhancement by three surfactants under steam explosion and mild chemical pretreatments in bioenergy Miscanthus. *Industrial Crops and Products*. 2020, 153, 112559. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112559>
- Sun, X.; Liu, S.; Zhang, X.; Tao, Y.; Boczkaj, G.; Yoon, J.Y.; Xuan, X. Recent advances in hydrodynamic cavitation-based pretreatments of lignocellulosic biomass for valorization. *Bioresource Technology*. 2022, 345, 126251. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126251>
- Supponen, O., Kobel, P., Obreschkow, D., & Farhat, M. (2015). The inner world of a collapsing bubble. *Physics of Fluids*, 27(9). <https://doi.org/10.1063/1.4931098>
- Szaja, A.; Montusiewicz, A.; Lebiocka, M. Challenges of Hydrodynamic Cavitation of Organic Wastes. *Applied Science*. 2022, 12, 7936. <https://doi.org/10.3390/app12157936>
- Tan, J., Song, Z., Chu, Q., Wei, W., & Wu, S. (2025). Comparison of properties of residual lignins of pine pretreated with alkaline and further oxidative delignification and their detaching behavior during enzymatic hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 284, 138095. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.138095>

Tan, H., Yang, R., Sun, W., & Wang, S. (2010). Peroxide– acetic acid pretreatment to remove bagasse lignin prior to enzymatic hydrolysis. *Industrial & engineering chemistry research*, 49(4), 1473-1479. <https://doi.org/10.1021/ie901529q>

Tapia-Torres, N. A., de la Paz-Pérez-Olvera, C., Román-Guerrero, A., Quintanar-Isaías, A., García-Márquez, E., & Cruz-Sosa, F. (2014). Histoquímica, contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de hoja y de madera de *Litsea glaucescens* Kunth (Lauraceae). *Madera y bosques*, 20(3), 125-137. <https://doi.org/10.21829/myb.2014.203157>

Terán Hilaes, R.; Dos Santos, J.C.; Ahmed, M.A.; Jeon, S.H.; da Silva, S.S.; Han, J.I. Hydrodynamic cavitation-assisted alkaline pretreatment as a new approach for sugarcane bagasse biorefineries. *Bioresource Technology*. 2016, 214, 609–614. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.004>

Terán Hilaes, R., Ienny, J.V., Marcelino, P.F., Ahmed, M.A., Antunes, F.A.F., da Silva, S.S., dos Santos, J.C., Ethanol production in a simultaneous saccharification and fermentation process with interconnected reactors employing hydrodynamic cavitation-pretreated sugarcane bagasse as raw material, *Bioresource Technology*, 243 (2017) 652–659. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.159>

Terán Hilaes, R., Dionízio, R.M., Prado, C.A., Ahmed, M.A., da Silva, S.S., Santos, J.C., Pretreatment of sugarcane bagasse using hydrodynamic cavitation technology: Semi-continuous and continuous process, *Bioresource Technology*, 290 (2019) 121777, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121777>

Thanekar, P., Gogate, P. R., Combined hydrodynamic cavitation based processes as an efficient treatment option for real industrial effluent, *Ultrasonics Sonochemistry*, 53, 2019, 202-213. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.01.007>

Thite, V. S., & Nerurkar, A. S. (2019). Valorization of sugarcane bagasse by chemical pretreatment and enzyme mediated deconstruction. *Scientific reports*, 9(1), 15904. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52347-7>

Tsalagkas, D., Börcsök, Z., Pásztor, Z., Gogate, P., & Csóka, L. (2021). Assessment of the papermaking potential of processed *Miscanthus* × *giganteus* stalks using alkaline pre-treatment and hydrodynamic cavitation for delignification. *Ultrasonics sonochemistry*, 72, 105462. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105462>

Tomar, G., Fuster, D., Zaleski, S., & Popinet, S. (2010). Multiscale simulations of primary atomization. *Computers & Fluids*, 39(10), 1864–1874. <https://doi.org/10.1016/j.compfluid.2010.06.018>

Valdés, J. P., Kahouadji, L., Liang, F., Shin, S., Chergui, J., Juric, D., Matar, O. K., (2023) Direct numerical simulations of liquid–liquid dispersions in a SMX mixer under different inlet conditions, *Chemical Engineering Journal*, 462, 142248, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.142248>

Valdés, J. P., Kahouadji, L., Matar, O. K., (2022) Current advances in liquid–liquid mixing in static mixers: A review, *Chemical Engineering Research and Design*, 177, 694–731. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2021.11.016>

van Wijngaarden, L (2016). Mechanics of collapsing cavitation bubbles. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 524–527, <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.04.006>

Velvizhi, G., Goswami, C., Shetti, N. P., Ahmad, E., Pant, K. K., & Aminabhavi, T. M. (2022). Valorisation of lignocellulosic biomass to value-added products: Paving the pathway towards low-carbon footprint. *Fuel*, 313, 122678. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122678>

Verdini, F., Calcio Gaudino, E., Grillo, G., Tabasso, S., Cravotto, G. Cellulose Recovery from Agri-Food Residues by Effective Cavitational Treatments, *Applied Science*, 2021, 11, 4693. <https://doi.org/10.3390/app11104693>

Vikhansky, A., CFD modelling of turbulent liquid–liquid dispersion in a static mixer, (2020), *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, 149, 107840, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.107840>

Vu, H.P.; Nguyen, L.N.; Vu, M.T.; Johir, M.A.H.; McLaughlan, R.; Nghiem, L.D. A Comprehensive Review on the Framework to Valorise Lignocellulosic Biomass as Biorefinery

Feedstocks. *Science of The Total Environment*. 2020, 743, 140630. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140630>

Wang, B., Su, H., & Zhang, B. (2021). Hydrodynamic cavitation as a promising route for wastewater treatment—A review. *Chemical Engineering Journal*, 412, 128685. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.128685>

Wang, J., Lan, D., Zhuang, J., Wang, Y., Pretreatment of *Camellia oleifera* shell by ethanolamine-based solvents for selective delignification and enhanced enzymatic saccharification, *Industrial Crops and Products*, 222, 2024, 119523. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119523>

Wang, X., Wang, J., Guo, P., Guo, W., & Wang, C. (2009). Degradation of rhodamine B in aqueous solution by using swirling jet-induced cavitation combined with H₂O₂. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1-3), 486-491. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.122>

Wang, Y., Li, D., Zhu, Y., Liu, J., Chen, H., Guo, Q., Du C., Miao Z., Cui L., Tian F., Liu J. & Zheng, H. (2022). Simulation and selection of static mixer, the core equipment of middle-low temperature coal tar pretreatment, based on the computational fluid dynamics. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 173, 108816. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2022.108816>

Wi, S.G.; Cho, E.J.; Lee, D.-S.; Lee, S.J.; Lee, Y.J.; Bae, H.-J. Lignocellulose Conversion for Biofuel: A New Pretreatment Greatly Improves Downstream Biocatalytic Hydrolysis of Various Lignocellulosic Materials. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8, 228. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0419-4>

Wittner, N., Slezsák, J., Broos, W., Geerts, J., Gergely, S., Vlaeminck, S. E., & Cornet, I. (2023). Rapid lignin quantification for fungal wood pretreatment by ATR-FTIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 285, 121912. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121912>

Wu, Z., Tagliapietra, S., Giraudo, A., Martina, K., Cravotto, G., Harnessing cavitation effects for green process intensification, *Ultrasonics – Sonochemistry*, 52 (2019) 530–546. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.12.032>

Xin, D.; Yang, M.; Chen, X.; Zhang, Y.; Ma, L.; Zhang, J. Improving the Hydrolytic Action of Cellulases by Tween 80: Offsetting the Lost Activity of Cellobiohydrolase Cel7A, *ACS Sustainable Chemical Engineerin.* 2017, 5, 11339–11345. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b02361>

Xu, A.; Li, W.; Zhang, Y.; Xu, H. Eco-friendly polysorbate aqueous solvents for efficient dissolution of lignin. *RSC Adv.* **2016**, 6(10), 8377–8379. <https://doi.org/10.1039/C5RA24570B>

Yang, M., Li, J., Wang, S., Zhao, F., Zhang, C., Zhang, C., & Han, S. (2023). Status and trends of enzyme cocktails for efficient and ecological production in the pulp and paper industry. *Journal of Cleaner Production*, 138196. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.138196>

Yıldırım, E. (2017). Analysis and testing of a contraction-and-expansion micromixer for micromilled microfluidics, *Microsystem Technologies*, 23, 4797–4804. <https://doi.org/10.1007/s00542-017-3291-2>

Ying, W.; Zhu, J.; Xu, Y.; Zhang, J. High solid loading enzymatic hydrolysis of acetic acid-peroxide/acetic acid pretreated poplar and cellulase recycling. *Bioresource Technology.* **2021a**, 340, 125624. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125624>

Ying, W., Sun, F., Li, X., & Zhang, J. (2023). Efficient high solid loading enzymatic hydrolysis of hydrogen peroxide/acetic acid-pretreated bamboo for monosaccharides production. *Industrial Crops and Products*, 197, 116588. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116588>

Ying, W.; Xu, Y.; Zhang, J. Surfactants protect the activities of endoglucanase and cellobiohydrolase from gas-liquid interface. *Industrial Crops and Products.* **2021b**, 171, 113958. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113958>

Yu, H.; Xu, Y.; Ni, Y.; Wu, Q.; Liu, S.; Li, L.; Yu, S.; Ji, Z. Enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose from waste paper fibers by cationic polymers addition. *Carbohydr. Polym.* **2018**, 200, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.079>

Yupanqui-Mendoza, S. L., Prado, C. A., dos Santos, J. C., & Arantes, V. (2023). Hydrodynamic cavitation as a promising pretreatment technology to enhance the efficiency of cellulose

nanocrystal production via enzymatic hydrolysis. *Chemical Engineering Journal*, 472, 144821. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.144821>

Zhang, J., Lei, L., Li, H., Xin, G., & Wang, X. (2022). Experimental and numerical studies of liquid-liquid two-phase flows in microchannel with sudden expansion/contraction cavities. *Chemical Engineering Journal*, 433, 133820. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.133820>

Zhang, H., Lujia Han, Hongmin Dong, An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Experimental and modeling studies, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 140, 2021a, 110758. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110758>.

Zhang, J.; Xie, J.; Zhang, H. Sodium hydroxide catalytic ethanol pretreatment and surfactant on the enzymatic saccharification of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*. 2021b, 319, 124171. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124171>

Zheng, H., Zheng, Y., Zhu, J., Recent Developments in Hydrodynamic Cavitation Reactors: Cavitation Mechanism, Reactor Design, and Applications. *Engineering* 19 (2022) 180–198. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.04.027>

Zheng, T., Jianxin Jiang, Jianfeng Yao, Surfactant-promoted hydrolysis of lignocellulose for ethanol production, *Fuel Processing Technology*, 213, 2021, 106660. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2020.106660>.

Zhou, Z., Denghao Ouyang, Dehua Liu, Xuebing Zhao, Oxidative pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis: Progress and challenges, *Bioresource Technology*, 367, 2023, 128208. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128208>

Zhou, Y.; Chen, H.; Qi, F.; Zhao, X.; Liu, D. Non-ionic surfactants do not consistently improve the enzymatic hydrolysis of pure cellulose. *Bioresource Technology*. **2015**, 182, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.137>

Zong, Z.; Ma, L.; Yu, L.; Zhang, D.; Yang, Z.; Chen, S. Characterization of the Interactions between Polyethylene Glycol and Cellulase during the Hydrolysis of Lignocellulose. *BioEnergy Res.* **2015**, 8, 270–278. <https://doi.org/10.1007/s12155-014-9516-7>

Zupanc, A., Petkovšek, M., Zdovc, B., Žagar, E., & Zupanc, M. (2024). Degradation of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) by acoustic and hydrodynamic cavitation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 109, 107020. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.107020>