

Universidad de Costa Rica

Faculta de Ingeniería

Escuela de Ingeniería de Biosistemas

**Evaluación del pretratamiento de remojo con amoníaco acuoso (SAA) para utilización  
de la fase sólida del rastrojo de piña en producción de azúcares fermentables**

Trabajo Final de Graduación para optar por el grado académico de Licenciatura en  
Ingeniería Agrícola y de Biosistemas

Diana Sandí Loaiza

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

San José, Costa Rica

2024

Esta tesis fue aceptada por la Comisión de trabajos finales de Graduación de la Escuela de Ingeniería de Biosistemas de la Universidad de Costa Rica, como requisito para optar al grado Licenciatura en Ingeniería Agrícola y de Biosistemas.



---

Diana Sandí Loaiza

Sustentante



---

Ing. Mauricio Bustamante Román, Ph.D.

Director del Trabajo Final de Graduación



---

Ing. Juan Pablo Rojas Sossa, M.Sc.

Miembro del Comité Asesor



---

Ing. Juliana Da Luz Castro, Lic.

Miembro del Comité Asesor



---

Ing. Alejandra Rojas, Ph.D.

Presidente del Tribunal examinador



---

Ing. Juan Chin Pampillo, Ph.D.

Lector Invitado

## **DEDICATORIA**

A mi familia, mis padres y mi hermano.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi familia por el apoyo brindado durante mi proceso de formación académica.

A mis amigos por la compañía y los ánimos brindados en el proceso.

A mi director de tesis Mauricio Bustamante y asesores Juan Pablo Rojas y Juliana Da Luz por el acompañamiento brindado y el conocimiento compartido.

Al equipo del laboratorio de Bioenergía; Ensio Pérez por la ayuda brindada, y a Daniela, Sofía, Priscila, Ana Cristina y Alessandro por el apoyo en el desarrollo de los experimentos.

## RESUMEN

En Costa Rica el cultivo de piña ha experimentado un auge notable en las exportaciones; superado al café en las últimas dos décadas y acercándose rápidamente a las cifras de exportación del banano. Este incremento en la producción de piña genera retos en la gestión debido a la alta generación de biomasa en el cultivo de la fruta, siendo el rastrojo el que ha ganado interés en la comunidad científica y académica por propiedades llamativas para uso comercial.

Las prácticas agrícolas actuales para su manejo, debido a que es un material lignocelulósico y que presenta una lenta degradación, incluyen el uso de herbicidas y la quema física, que pueden provocar daños ambientales y de salud pública si no se realiza de una manera adecuada. El establecimiento de una estrategia de revalorización que permita la utilización del rastrojo como materia prima para la producción de subproductos, como el etanol, puede reducir no solo los costos asociados con el tratamiento de los residuos agroindustriales, sino también reducir el impacto ambiental y generar un beneficio socioeconómico a la actividad piñera.

El rastrojo de piña es una biomasa residual con alto contenido de carbono recalcitrante. Este trabajo final de graduación investiga su pretratamiento termoquímico para aprovechar los azúcares presentes en la pared celular. Específicamente se investigó el remojo en amoníaco acuoso (SAA), ya que es un método que busca facilitar la liberación de estos azúcares, que luego pueden ser utilizados en fermentaciones alcohólicas.

El propósito de esta investigación es evaluar la revalorización del rastrojo de piña, aprovechando la fase sólida a través del pretratamiento SAA con el fin de mejorar el rendimiento en un modelo de biorrefinería para la producción de etanol.

La investigación se enfoca en la evaluación de parámetros críticos como la temperatura, el tiempo de residencia, la relación de la fase sólido/líquido y características de la biomasa utilizada. Además, se realizará un análisis tecno-económico para integrar este tratamiento en una biorrefinería, buscando una solución sostenible y económicamente viable para la industria.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	x
<b>ABREVIATURAS</b> .....	xi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. <i>Justificación del proyecto</i> .....	1
1.2. <i>Delimitación del problema</i> .....	4
1.3. <i>Objetivos</i> .....	6
1.3.1. <i>Objetivo General</i> .....	6
1.3.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	7
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	7
2.1. <i>Antecedentes</i> .....	7
2.2. <i>Marco Conceptual</i> .....	8
2.2.1. <i>Cultivo de piña</i> .....	8
2.2.2. <i>Caracterización de biomasa</i> .....	11
2.2.3. <i>Producción de Bioetanol</i> .....	14
2.2.4. <i>Uso de biomasa de segunda generación para producción de etanol</i> .....	16
2.2.4.1. <i>SAA: Remojo con amoníaco acuoso</i> .....	19
2.2.4.2. <i>Tratamiento con ácido diluido</i> .....	20
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	20
3.1. <i>Caracterización de la biomasa del rastrojo de piña</i> .....	21
3.2. <i>Evaluación para establecer el mejor tratamiento de SAA</i> .....	27
3.2.1. <i>Pretratamiento con ácido diluido</i> .....	30
3.2.2. <i>Análisis estadístico</i> .....	31
3.3. <i>Evaluación tecno-económica para integrar el proceso SAA</i> .....	32
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	33
4.1. <i>Caracterización de la biomasa del rastrojo de piña</i> .....	33
4.2. <i>Evaluación para establecer el mejor tratamiento SAA</i> .....	39
4.2.2 <i>Comparación con tratamiento con ácido diluido</i> .....	48
4.3 <i>Evaluación tecno-económica para integrar el proceso SAA</i> .....	51
4.3.1. <i>Análisis económico</i> .....	54

<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	61
<b>6. RECOMENDACIONES</b> .....	62
<b>7. BIBIOGRAFÍA</b> .....	63
<b>6. ANEXOS</b> .....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Proceso de producción de etanol a partir de rastrojo de piña .....	6
<b>Figura 2.</b> Fases fenológicas del cultivo de piña (Vargas et al., 2018).....	9
<b>Figura 3.</b> Rastrojo de piña tratado en campo (Hernández y Prado, 2018).....	10
<b>Figura 4.</b> Diagrama de caracterización de rastrojo molido .....	12
<b>Figura 5.</b> Molino adaptado para moler el rastrojo de piña desfibrado .....	22
<b>Figura 6.</b> Diagrama de pruebas para caracterización de biomasa .....	23
<b>Figura 7.</b> Extractor de fibra cruda con muestras de hoja y tratamiento con alcohol etílico.....	25
<b>Figura 8.</b> Diagrama de procesos para realizar pretratamiento SAA.....	28
<b>Figura 9.</b> Rastrojo de piña recolectado en campo.....	34
<b>Figura 10.</b> Microscopia electrónica a 100 $\mu\text{m}$ de la hoja antes del tratamiento .....	38
<b>Figura 11.</b> Microscopia electrónica a 100 $\mu\text{m}$ de tallo seco sin tratamiento .....	39
<b>Figura 12.</b> Gráfica de cajas para evaluar la homogeneidad de las varianzas de todos los tratamientos .....	42
<b>Figura 13.</b> Gráfico de normalidad de los residuos .....	43
<b>Figura 14.</b> Microscopia electrónica a 100 $\mu\text{m}$ de hoja tratada con hidróxido de amonio.....	46
<b>Figura 15.</b> Microscopia electrónica a 100 $\mu\text{m}$ de tallo tratado con hidróxido de amonio .....	47
<b>Figura 16.</b> Microscopia electrónica a 100 $\mu\text{m}$ de hoja tratada con ácido diluido.....	49
<b>Figura 17.</b> Microscopia electrónica a 100 $\mu\text{m}$ de tallo tratada con ácido diluido.....	50
<b>Figura 18.</b> Distribución en planta para integrar el proceso SAA .....	53
<b>Figura 19.</b> Balance de masa de producción de etanol a partir de rastrojo de piña.....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Caracterización de hoja de rastrojo de piña (Liao et al, (2022)).....	13
<b>Tabla 2.</b> Tratamientos aplicados a la biomasa según los diferentes parámetros evaluados .....	29
<b>Tabla 3.</b> Caracterización del rastrojo fresco recolectado en campo <sup>A</sup> .....	34
<b>Tabla 4.</b> Caracterización de la biomasa molida, seca a 60 °C y estandarizada a 2 mm <sup>A</sup> .....	35
<b>Tabla 5.</b> Medición de masa del rastrojo previo al derribo.....	36
<b>Tabla 6.</b> Caracterización de biomasa después del tratamiento SAA <sup>A</sup> .....	40
<b>Tabla 7.</b> Resultados del análisis de varianza de los diferentes tratamientos aplicados .....	44
<b>Tabla 8.</b> Resultado de prueba Tukey para evaluar diferencia de tratamientos .....	45
<b>Tabla 9.</b> Caracterización de la biomasa después del tratamiento con ácido diluido <sup>A</sup> .....	48
<b>Tabla 10.</b> Inversiones iniciales para implementar el pretratamiento al concepto de biorrefinería ....	56
<b>Tabla 11.</b> Análisis financiero anual para la implementación del proceso SAA a una biorrefinería <sup>A</sup> .....	57
<b>Tabla 12.</b> Análisis financiero para la implementación del proceso ácido diluido a una biorrefinería <sup>A</sup> .....	59

## **ABREVIATURAS**

AFEX: expansión de fibras de amoniaco

CH: Contenido de humedad

C+H: Celulosa y hemicelulosa

H: Hoja

HT: Mezcla hoja-tallo

LI: Lignina insoluble

LS: Lignina soluble

NREL: Laboratorio de Energías Renovables de Estados Unidos

SAA: Remojo en amoniaco acuoso

ST: Sólidos Totales

SV: Sólidos volátiles

TIR: Tasa interna de retorno

VAN: Valor actual neto

CIEMic: Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas

# 1. INTRODUCCIÓN

## *1.1. Justificación del proyecto*

La piña (*Ananas comosus*), es un producto de gran importancia para la economía de países tropicales y subtropicales; ha adquirido relevancia en el sector agrícola ya que genera fuentes de empleo formales en el proceso de producción y comercialización, ya sea de fruto fresco o en procesos de industrialización durante todo el año. La piña es la tercera fruta tropical con mayor importancia en el mundo, siendo Filipinas, Brasil, Costa Rica, Tailandia y China los principales productores, que representan un 55% de la producción mundial (Decheco, 2016). A nivel de mercado de consumo, países europeos consumen un 49% de la piña producida en Costa Rica, mientras que Estados Unidos consume el 46% (Maglianesi, 2013).

Específicamente en Costa Rica, el cultivo de piña ha tenido un crecimiento importante en las exportaciones; en poco más de 20 años el cultivo de piña superó las exportaciones de café y se ha acercado mucho a las exportaciones de banano, para el año 2021 las exportaciones de piña en Costa Rica registraron un valor de 1 024 millones de dólares (PROCOMER, 2022). El área de siembra de piña es menor al área de siembra de café y banano; sin embargo, la piña genera más divisas por hectárea, remarcando la importancia para el cultivo por su volumen de exportación, principalmente en comparación con productos tradicionales (Hernández y Prado, 2018).

El cultivo de piña tiene gran importancia económica para el país, pero se ha visto en polémica en medios de información ya que su producción es altamente dependiente de agroquímicos como pesticidas, insecticidas, abonos y fungicidas; lo que puede generar un impacto al medio ambiente y a la salud humana y animal. Adicionalmente, una vez concluido el ciclo de producción de la fruta, se deben manejar los desechos en campo que representan gran

cantidad de la planta (llamado rastrojo en la industria piñera). Dado que el rastrojo de piña es un material con alto contenido del complejo lignocelulósico, su degradación es lenta y se requiere de prácticas agrícolas que emplean herbicidas para destruir la planta y posteriormente se queman físicamente. Estas acciones son necesarias ya que el residuo expuesto al ambiente genera proliferación de la mosca de establos (*Stomoxys calcitrans*) la cual afecta al sector ganadero y comunidades cercanas a la plantación (Córdoba y Molina, 2014).

El rastrojo de piña tiene características llamativas para su utilización como sustrato en conversiones biológicas para productos energéticos, sustitutos de combustibles como el petróleo, que es la principal fuente de energía primaria a nivel mundial y en Costa Rica, el sector transporte es altamente dependiente del combustible. Dada la volatilidad de precios en el mercado internacional, y el efecto negativo al medio ambiente, es necesario encontrar soluciones locales para sustituir el uso de petróleo. El rastrojo de piña puede ser una solución para desplazar el uso de combustibles por etanol dando un enfoque de aprovechamiento de recursos y economía circular.

Adicionalmente, la demanda de etanol como biocombustible ha aumentado en los últimos años, esto debido a la incertidumbre de la disponibilidad de petróleo a largo plazo y el conocimiento de las implicaciones ambientales del uso de combustibles fósiles. Sin embargo, las materias primas para la producción de son principalmente productos con altos contenidos de almidón y sacarosa, los cuales también son considerados alimento, por lo que se compromete su disponibilidad y precio (Córdoba y Molina, 2014). Los materiales lignocelulósicos como el rastrojo de piña resultan una alternativa ya que se encuentran disponibles en grandes cantidades, y no son considerados alimento para la humanidad. Este

tipo de material está compuesto por lignina, celulosa y hemicelulosa. La celulosa y hemicelulosa son compuestos capaces de degradarse en azúcares fermentables por medio de procesos como la hidrólisis (Córdoba y Molina, 2014).

El uso de residuos agrícolas como materias primas para generar subproductos como el etanol, no solamente logra disminuir los costos asociados a la eliminación de los residuos de las agroindustrias, sino que logra disminuir el impacto ambiental (Decheco, 2016). Estos procesos de transformación de los residuos orgánicos en fuentes de energía renovables están ligados al uso de nuevas tecnologías (Jaikel y Ulate, 2021) que deben ser estudiadas y adaptadas para crear procesos técnica y económicamente viables.

Implementar un proyecto de utilización de biomasa del cultivo de piña podría minimizar el problema de la industria ante la problemática del rastrojo, mientras que aportaría un producto de alto valor energético para el sector transporte, por lo que la industria ha mostrado un interés en tecnologías que puedan hacer uso del rastrojo a gran escala. El uso del material externamente daría un modelo de negocio nuevo al generar productos de alto valor comercial para Costa Rica.

Esta investigación se relaciona con el objetivo 7 de los objetivos de desarrollo sostenible (ODS), el cual busca tener energía asequible y no contaminante, ya que el consumo de energía sigue siendo la principal causa del cambio climático; la mayoría de esta energía proviene de combustibles y tecnologías contaminantes, además, se relaciona con el objetivo 11, que busca ciudades y comunidades sostenibles, ya que la contaminación de cualquier tipo deteriora la salud de la población, al implementar prácticas que permitan mejorar la economía y reducir riesgos de contaminación se puede mejorar el desarrollo de las comunidades. La

investigación busca la producción de etanol a partir de un residuo agrícola, permitiendo dar un segundo uso a los residuos y produciendo energías limpias.

### *1.2. Delimitación del problema*

La producción piñera en Costa Rica para el año 2019 registró una producción mayor a 65 000 hectáreas, de las cuales la mayoría se ubican en la región Huetar Norte con un 68% de la producción, seguida en la región Huetar Atlántico donde se produce un 19%, y la región Pacífico Sur cuenta con un 12% de producción (Arguedas et al., 2021). Ante esta alta producción de piña, el cultivo tiene particularidades que han sido todo un reto para los productores, gobiernos y academia. En promedio cada dos ciclos de cultivo, la planta debe remplazarse para mantener un rendimiento alto de fruta; lo que genera gran cantidad de rastrojo de piña que debe tratarse.

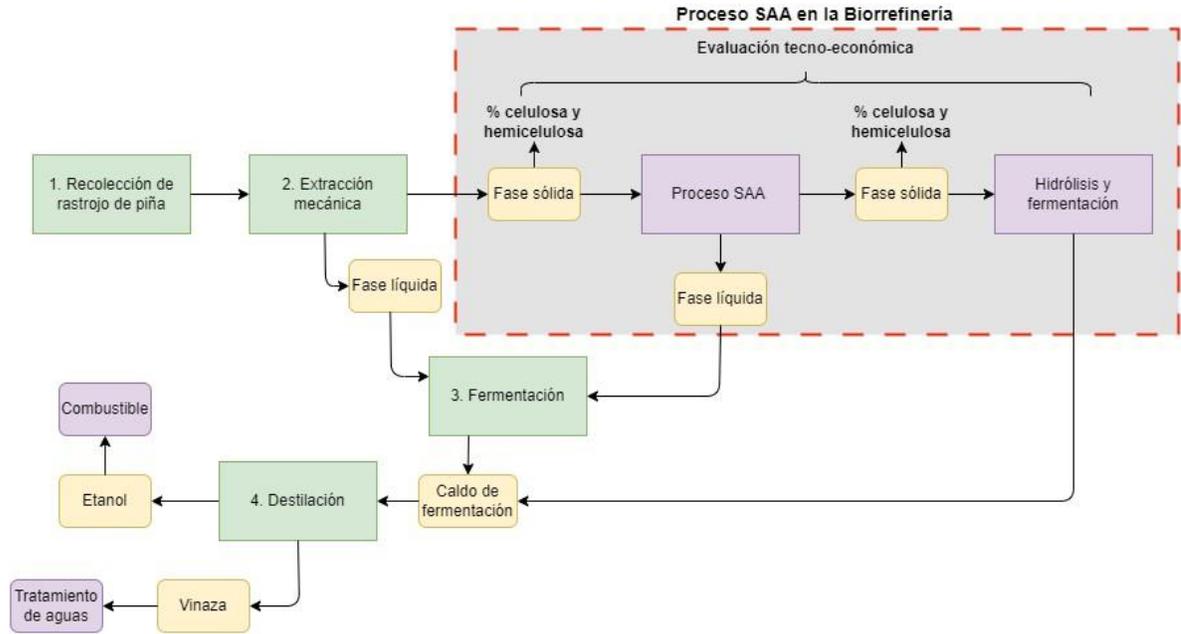
El proceso de producción de bioetanol bajo el concepto de biorrefinería consiste en la recolección del rastrojo de piña en campo, el cual posteriormente pasa por un prensado mecánico, donde se da una primera separación de las fases sólida y líquida (Liao et al., 2022). La fase sólida es sometida al proceso de pretratamiento de remojo en amoníaco acuoso (SAA por sus siglas en inglés), que es una hidrolización termoquímica donde se produce nuevas fases sólida y líquida. El producto de la hidrolización termoquímica es filtrado, donde la fase sólida es tratada en una hidrolización enzimática para la extracción de los azúcares de la pared celular. Posteriormente, las fases líquidas se mezclan junto con el azúcar obtenido en la hidrólisis enzimática para la fermentación, al finalizar la fermentación se continúa con la destilación del etanol.

Dada la gran cantidad de carbono recalcitrante <sup>1</sup> en el rastrojo de piña, es decir, tiene una lenta degradación por su resistencia a los tratamientos químicos y biológicos, el presente trabajo final de graduación estudia del pretratamiento hidrolítico termoquímico para el aprovechamiento de los azúcares de la pared celular de las hojas y del tallo de la planta, analizando la hoja (H) del rastrojo que representa la mayoría de la planta y la mezcla de hoja y tallo (HT) que representa el residuo del cultivo completo. Esto debido a que estos dos componentes del rastrojo pueden tener diferencias en su estructura, ya que los materiales lignocelulósicos presentan varias barreras químicas y ultraestructurales poco conocidas que pueden afectar la conversión de las paredes celulares en azúcares fermentables (Chundawat et al., 2011).

El remojo en amoníaco acuoso es uno de los pretratamientos que facilita la obtención de estos azúcares, para uso en fermentaciones alcohólicas. La implementación de un pretratamiento en el proceso de producción de azúcares fermentables permitiría dar un mayor aprovechamiento de la biomasa que generaría una posible mejora de los rendimientos del proceso de revalorización, lo que resultaría más atractivo económicamente que el actual tratamiento que se le da al rastrojo. La Figura 1 muestra el concepto de la biorrefinería para producción de etanol; para el alcance de este trabajo final de graduación, se considera únicamente la adición de un proceso nuevo, el SAA, como proceso intermedio para aumentar la cantidad de azúcar en la línea de fermentación.

---

<sup>1</sup> El carbono recalcitrante es una fracción de carbono en el suelo que se resiste a la descomposición y la mineralización. Se caracteriza por su alta estabilidad ya que la descomposición y transformación es mucho más lenta en comparación con otras formas de carbono (Fang et al., 2005).



**Figura 1.** Proceso de producción de etanol a partir de rastrojo de piña

### 1.3. Objetivos

#### 1.3.1. Objetivo General

Evaluar la revalorización del rastrojo de piña para el aprovechamiento de la fase sólida mediante el pretratamiento tipo SAA para el mejoramiento del rendimiento en un concepto de biorrefinería para la producción de etanol.

### *1.3.2. Objetivos específicos*

- i. Caracterizar las hojas de piña, y una mezcla de hoja y tallo para la determinación de la cantidad de carbohidratos estructurales en la matriz celular como materia prima para la producción de etanol.
- ii. Evaluar los parámetros de temperatura, tiempo de residencia y diferentes relaciones sólido/líquido en el pretratamiento SAA para establecer la mejor condición para la obtención de azúcares fermentables.
- iii. Evaluar tecno-económicamente la integración del proceso SAA para la generación de azúcares fermentables en el concepto de biorrefinería de residuos agrícolas.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### *2.1. Antecedentes*

En Costa Rica se producen grandes cantidades residuos producto del cultivo de piña, la gestión de estos residuos es compleja debido a la cantidad de biomasa residual que se genera. Las prácticas más comunes para el manejo del residuo es incorporarlo en el campo, este proceso de incorporación se facilita al realizar una quema química y física para luego enterrarlo por medio de equipo agrícola. Al dejar el rastrojo en el campo e incorporarlo sin realizar los procesos de quema, este material puede tardar hasta un año en descomponerse, dado las particulares características de este subproducto; adicionalmente, la exposición del rastrojo de piña en campo lo convierte en un hospedero de la mosca de establo, que se considera un problema para la ganadería.

Además, el incorporar el rastrojo al suelo sin realizar los procesos de quema afecta a los productores ya que la piña es un cultivo intensivo, y la lenta degradación del desecho afecta

la productividad. La quema de los desechos genera contaminación ambiental y también afecta los rendimientos del cultivo ya que se disminuye en gran cantidad la presencia de hongos y microorganismos en el suelo lo que afecta la relación simbiótica suelo-planta (Moya, 2022).

Hernández y Prado (2018) estimaron que en 43 000 hectáreas de cultivo de piña se producen alrededor de 4 282 000 toneladas por año en base húmeda de biomasa proveniente del rastrojo; además, estimaron los costos asociados con el manejo de los residuos en el campo y los posibles tratamientos que se le pueden dar al desecho. Los costos para el manejo de rastrojo de piña en el campo oscilan entre \$1 000 y \$2 500 por hectárea, dependiendo del tipo de tratamiento que se le dé.

Liao et al (2022) realizaron un análisis técnico-económico para evaluar el ciclo de vida de aprovechamiento de las hojas de rastrojo de piña para la producción de etanol y alimento animal. El análisis muestra que en Costa Rica el proceso puede producir 92 708 y 64 859 toneladas de bioetanol y levadura al año, respectivamente, en 44 500 hectáreas de plantaciones de piña en una biorrefinería con capacidad de producir 50 000 toneladas métricas por año de etanol, la que podría tener un período de recuperación de 4,72 años. Esto genera además de las ventajas del concepto de biorrefinería, beneficios sobre las practicas actuales de quema a cielo abierto.

## *2.2. Marco Conceptual*

### *2.2.1. Cultivo de piña*

El cultivo de la inflorescencia de *Ananas comosus* (conocido como piña) se puede dividir en 5 fases las cuales inician con el crecimiento vegetativo, seguido por la inducción floral, la floración, el desarrollo del fruto y finalmente la maduración de la planta. El tiempo de duración del ciclo completo depende de la variedad del cultivo, y de las condiciones

productivas donde se desarrolle el cultivo, en la Figura 2 se muestran las fases fenológicas del cultivo de piña (Vargas et al., 2018).



**Figura 2.** Fases fenológicas del cultivo de piña (Vargas et al., 2018).

La fase del crecimiento vegetativo que contempla desde la siembra hasta la inducción floral es la etapa de mayor tiempo, ya que el desarrollo de la planta es lento, se da la formación de hojas y del tallo, esta etapa tarda 7 meses aproximadamente. La inducción floral se da al inicio de la etapa reproductiva de la planta, cuando la planta alcanza alrededor de 35 a 45 hojas y un peso aproximado de 2,2 a 2,5 kg, esta etapa tarda alrededor de 30 días. La etapa de floración puede producir hasta 150 flores y tarda alrededor de 15 días, después inicia el desarrollo del fruto donde se empieza a hinchar el ovario y cambiar su tonalidad, la duración de esta etapa depende de la variedad, la época y las condiciones de siembra. Finalmente, la maduración es cuando la fruta alcanza las condiciones ideales para ser cosechada, y tarda entre 15 y 30 días (Vargas et al., 2018).

Después de concluidos los ciclos de cosecha se tiene el rastrojo de piña el cual está compuesto de la totalidad de la planta: raíz, tallo, hijos secundarios y hojas, cuando se descartan para preparar el terreno para un nuevo ciclo de siembra (Hernández y Prado, 2018), los ciclos de siembra se renuevan cada dos o tres años, dependiendo de la variedad y del tiempo que se deshija para nuevos lotes. El rastrojo de piña es un material lignocelulósico, este material es

el componente principal de la pared celular de la célula vegetal, está compuesto principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, además de pequeñas cantidades de pectina, proteínas, clorofila, grasas y ceniza (Córdoba y Molina, 2014).

Este material es considerado un desecho del sector agrícola, se produce en grandes cantidades y es considerado de difícil degradación, ya que uno de los componentes principales de la pared es la lignina, la cual le aporta impermeabilidad, soporte y resistencia a ataques o estrés oxidativo; lo que lo convierte en un problema ambiental. Las hojas de la piña son sumamente fibrosas, tiene cordones de fibra que le permiten tener una alta resistencia a la torsión (Córdoba y Molina, 2014). En la Figura 3 se muestra el proceso tradicional que se le da al rastrojo en campo.

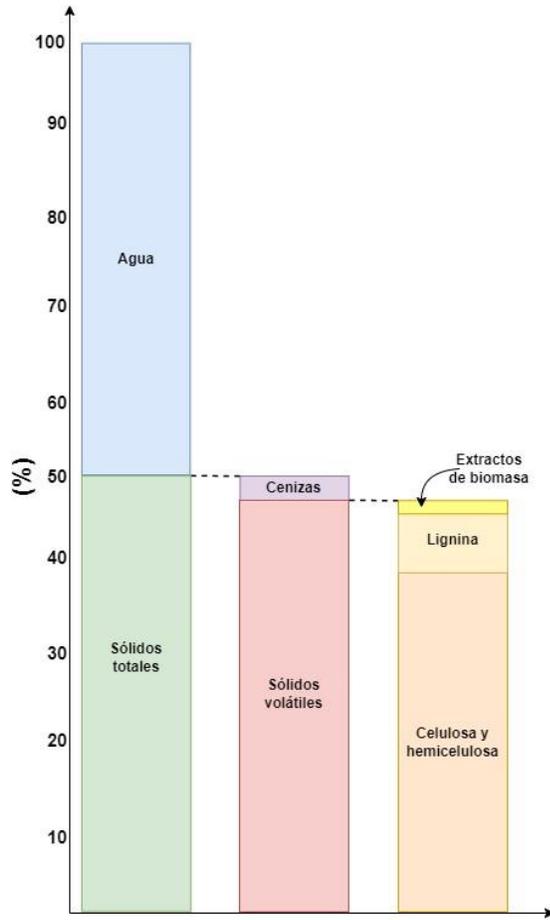


**Figura 3.** Rastrojo de piña tratado en campo (Hernández y Prado, 2018)

### *2.2.2. Caracterización de biomasa*

Para caracterizar la biomasa se requiere determinar los sólidos totales (ST), lo cual se refiere a todos los componentes sólidos presentes en la muestra. Por otra parte, es necesario determinar los sólidos volátiles (SV), los cuales corresponden a fracciones de los sólidos totales que se volatilizan o descomponen cuando la muestra se somete a altas temperaturas. Los sólidos volátiles se componen de materia orgánica como grasas, proteínas y carbohidratos que se descomponen y liberan gases al someterse a altas temperaturas (Castillo, 2013)

La caracterización de la biomasa incluye el contenido de humedad (CH) de la muestra y los ST, y partir de los ST se determina el porcentaje de ceniza y de SV. Con el contenido de SV se determina el porcentaje de lignina (incluye la lignina soluble e insoluble), y finalmente, el porcentaje de celulosa y hemicelulosa (C+H) presente en la biomasa. En la Figura 4 se muestra la composición de las variables de caracterización del rastrojo molido, realizada en el laboratorio.



**Figura 4.** Diagrama de caracterización de rastrojo molido

La biomasa pasa por un proceso de purificación, se retiran los extractos de biomasa con el fin de obtener únicamente la matriz de la pared celular estructural, ya que los productos de interés son los azúcares fermentables. Este procedimiento consiste en el aprovechamiento de la solubilidad de las impurezas tanto polares como no polares, por lo que se utiliza agua y alcohol o acetona (Fernández, 2024).

Según Liao et al (2022) la hoja del rastrojo de piña presenta valores de ST cercanos al 14% (base húmeda), y se estima un valor cercano al 50% de C+H sobre el valor de ST. La Tabla 1 muestra la caracterización de la hoja de rastrojo de piña.

**Tabla 1.** Caracterización de hoja de rastrojo de piña (Liao et al, (2022).

<b>Parámetro</b>	<b>Hoja</b>
ST (%)	13,8
Celulosa (%ST)	22,6
Hemicelulosa (%ST)	26,1
Lignina (%ST)	7,3
Proteína cruda (%ST)	6,9
Grasa cruda (%ST)	3,0
Potasio (%ST)	2,6
Nitrógeno (%ST)	1,1
Fósforo (%ST)	0,11
Azufre (%ST)	0,13
Ceniza (%ST)	6,1

La hemicelulosa está formada por cadenas de diferentes azúcares, que se conectan con la lignina y la celulosa mediante enlaces covalentes. Mientras que la celulosa se compone de unidades de celobiosa ( $\beta$  1-4-D-glucopiranososa unida) que forman una estructura cristalina difícil de degradar. La lignina es la fracción más recalcitrante debido a su estructura aromática. Sus moléculas fenólicas; reducen la superficie de la celulosa y obstaculiza la actividad enzimática (Murillo, 2018).

Ramírez et al., (2012) en su estudio indican que la celulosa y hemicelulosa se puede transformar en glucosa y xilosa por medio del proceso de hidrólisis ácida. En el estudio se encontró que para la cáscara de piña con una concentración de celulosa y hemicelulosa del 65,61% se pueden obtener rendimientos de 14,27 g/L de xilosa y 2,57 g/L de glucosa, lo que

representa un 85,2% de potencial, esto bajo hidrólisis ácida con  $H_2SO_4$  a una concentración del 2%.

### *2.2.3. Producción de Bioetanol*

El bioetanol es un recurso energético obtenido de materia orgánica, el cual tiene un alto uso en la industria debido a sus propiedades como solvente, limpiador, y alto poder calorífico. Existen varias clasificaciones de bioetanol según la materia prima y el tipo de proceso que se lleva a cabo para producirlo, se clasifican en generaciones de acuerdo con la fuente y material utilizados (Morales, 2020).

El bioetanol de primera generación se obtiene a partir de partes alimenticias de plantas con alto contenido de azúcares, almidón y aceites, por lo que tienen la ventaja ser catalogados como energías limpias pero que compiten con cadena alimentaria. El de segunda generación utiliza como materia prima los residuos agroindustriales y forestales, los cuales se componen principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina. Por lo que presenta la ventaja de no utilizar alimentos para su fabricación, sin embargo, es difícil separar la celulosa de la lignina para convertirla en bioetanol (Morales, 2020).

El bioetanol de tercera generación se genera a partir de vegetales no alimenticios de rápido crecimiento y con alta capacidad energética almacenada, tiene la desventaja de competir con el uso de suelos de cultivo de alimentos para sembrar estos insumos. Finalmente, los de cuarta generación se producen con bacterias modificadas genéticamente, estas bacterias utilizan una fuente de carbono para producir biocombustible (Morales, 2020).

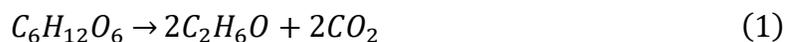
La producción mundial anual de etanol para el año 2021 fue de 103,3 millones de metros cúbicos, donde resaltan como los principales productores Estados Unidos y Brasil aportando

un 82 % de la producción mundial. En Costa Rica, existen dos destilerías principales que producen etanol como biocombustible, Catsa y Taboga, cuya producción de etanol es de alrededor de 40 millones de litros por año (RECOPE, 2023).

El etanol tiene diversos usos entre ellos como sustituto para una parte de los combustibles fósiles, en Costa Rica se han realizado estudios técnicos y financieros para analizar la viabilidad de esta transición hacia el uso de mezclas de gasolina con etanol para la flotilla nacional, esto para mejorar el rendimiento del combustible en motores de combustión, reducir el consumo y disminuir los gases de efecto invernadero. En Costa Rica, se han considerado implementar diferentes mezclas de etanol con gasolina, como el E10 (10% de etanol) o E85 (85% etanol), que se utiliza en varios países desarrollados (RECOPE, 2023).

La producción de bioetanol es un proceso que incluye diferentes etapas, de manera general, está conformado por la preparación de la materia prima, la hidrólisis (si es requerida), fermentación, separación del alcohol, deshidratación y tratamiento de residuos (Llenque et al., 2020).

La fermentación es un proceso que se da en completa ausencia de oxígeno, es el resultado de la actividad microbiana que se encarga de procesar especies o formas de carbono, como algunos azúcares. Como resultado de la fermentación alcohólica se obtiene el alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono gaseoso y moléculas de ATP que son consumidas por los microorganismos mientras se lleva a cabo la fermentación (Suárez et al., 2016). Para realizar este proceso de fermentación se emplea comúnmente la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, este microorganismo se encarga de transformar el azúcar ( $C_6H_{12}O_6$ ) en alcohol etílico y dióxido de carbono ( $CO_2$ ), como se muestra en la ecuación (1)



El proceso de fermentación inicia con la glucólisis donde la glucosa entra en el proceso, y se degrada para convertirse en ácido pirúvico, el piruvato se transforma en acetaldehído dióxido de carbono, finalmente, el acetaldehído se reduce a etanol. El proceso de fermentación presenta un rendimiento teórico de 0,511 g de etanol por cada gramo de glucosa. Este es un proceso que se utiliza comúnmente en la industria alimentaria para la producción de pan, vino, cerveza, entre otros (Arellano, 2015)

Después de la etapa de fermentación se debe realizar una destilación, esto con el objetivo de separar el etanol de los demás componentes. Este proceso se realiza aprovechando la diferencia de volatilidad de los componentes presentes en la mezcla, se separa el componente volátil, en este caso alcohol de los no volátiles (Santos y Zabala, 2016).

#### *2.2.4. Uso de biomasa de segunda generación para producción de etanol*

La materia lignocelulosa presenta heterogeneidad química lo que dificulta la digestibilidad e impide el ataque microbiano de la celulosa y hemicelulosa. Por lo que se emplea el uso de diferentes pretratamientos que facilitan el procesamiento de este tipo de materiales. Diversos tipos de pretratamiento se han estudiado para romper la lignina y facilitar la digestibilidad de los azúcares del material, estos tratamientos se aplican según las características de la materia lignocelulósica y según lo que se desee obtener.

Entre los pretratamientos se encuentran el mecánico que busca disminuir el tamaño de las partículas con el fin de aumentar el área superficial y el tamaño del poro, así como la reducción del grado de polimerización. El aumento del área superficial y la disminución del grado de polimerización generan un aumento en el rendimiento de hidrolización del material

lignocelulósico (Cortes, 2014). Por ejemplo, Espinoza et al. (2021) usaron el tratamiento mecánico para mejorar los rendimientos de productividad de metano en diferentes biomásas, encontraron que se puede aumentar hasta un 60% los rendimientos de la biomasa.

Por otra parte, los pretratamientos térmicos permiten solubilizar la hemicelulosa y lignina, esto se da al alcanzar temperaturas superiores a los 150 °C. La reactividad térmica de la biomasa depende de la composición, durante estos procesos se hidroliza la hemicelulosa y forma ácidos (Cortes, 2014). Los tratamientos con agua caliente y exposición de vapor forman parte los pretratamientos térmicos, Espinoza et al. (2021), presenta un estudio donde se usaron temperaturas con un rango entre 160-250 °C. Se obtuvo una remoción significativa de hemicelulosa, lo cual enriqueció el contenido de lignina e incrementó la celulosa; lo que generó un incremento de hasta un 150% en la producción de biogás aplicando el pretratamiento con agua caliente.

Los pretratamientos ácidos buscan romper las fuerzas de Van der Waals, los enlaces de hidrógeno y los enlaces covalentes que unen los diferentes componentes de la biomasa, con el fin de romper las estructuras y obtener los compuestos orgánicos de la materia. Los ácidos usados frecuentemente para este tipo de procedimientos son el ácido sulfúrico, pero también se puede utilizar el ácido acético, nítrico y clorhídrico, este es un tratamiento que puede presentar rendimientos de hasta un 100%; sin embargo, depende de muchos factores como la temperatura, el pH, tiempo y demás (Espinoza et al., 2021).

Por otra parte, los tratamientos biológicos pueden ser por acción de hongos, bacterias o enzimas, para el caso del tratamiento enzimático se requiere de la acción combinada de tres tipos de enzimas dado que la biomasa lignocelulósica es compleja de hidrolizar por lo que una sola enzima no puede realizar este proceso. La endoglucanasa que se encarga de cortar

las cadenas de celulosa generando extremos reductores, la exoglucanasa o celobiohidrolasa que actúa de forma progresiva en los extremos reductores y genera la glucosa y celobiosa y la  $\beta$ -glucosidasa se encargan de hidrolizar la celobiosa para generar monómeros de glucosa. El rendimiento de la hidrólisis enzimática depende del grado de degradación de lignina (Arellano, 2015).

Petrus, (2018) para el caso de material lignocelulósico en tratamientos industriales menciona el uso de enzimas celulóticas, las cuales se producen en su mayoría por especies como *Trichoderma*, *Humicola* y *Aspergillus*, estas se usan comercialmente ya que tienen la capacidad de convertir material que tiene hemicelulosa insoluble en azúcares reductores.

Los pretratamientos alcalinos provocan la hinchazón de las partículas orgánicas, lo que causa la deslignificación y ruptura de los enlaces intermoleculares. Para este tratamiento se pueden emplear soluciones de hidróxido de sodio, calcio, potasio y amonio (Espinoza et al., 2021).

El proceso de expansión de fibras de amoníaco (AFEX) ha sido altamente estudiado, presentado por Ankita et al. (2023), donde se trata a biomasa con amoníaco líquido bajo presiones que oscilan entre 200 y 400 psi, a temperaturas de 80 a 150 °C durante tiempo de residencia entre 5 y 30 minutos. Esto provoca la hinchazón de las células y la alteración de la estructura fibrosa lo que genera alta accesibilidad a las enzimas en el proceso de hidrólisis.

Los autores encontraron rendimientos casi 6 veces mejores en pasto varilla tratado con AFEX en comparación con pasto sin tratar, esto para el proceso de hidrólisis enzimática posterior.

Adicionalmente, el remojo con amoníaco acuoso puede ser utilizado como alternativa al AFEX, con ventajas de que usa temperaturas moderadas y presenta una alta eliminación de lignina lo que mejora el proceso de hidrolización mejorando los rendimientos de azúcares, pero presenta la desventaja que puede llegar a producir inhibidores para las etapas posteriores

al pretratamiento (Novia et al., 2020). La siguiente sección desarrolla más el tema correspondiente.

#### *2.2.4.1. SAA: Remojo con amoníaco acuoso*

El pretratamiento de remojo con amoníaco acuoso (SAA) tiene como objetivo reducir el contenido de lignina en la biomasa (Novia et al., 2020) y crea un sustrato con mayor área superficial, que es requerido para mejorar la eficiencia en el uso de enzimas como la celulasa, que se encarga de romper los enlaces glucosídicos de la matriz de celulosa. El pretratamiento SAA es selectivo con las reacciones de la lignina, por lo que se dice que es eficaz para materias primas provenientes de residuos agrícolas o biomasas herbáceas, además, es un tratamiento que conserva los carbohidratos debido a la que es un tratamiento básico suave (Rajesh, 2010).

El pretratamiento de remojo con amoníaco acuoso es un proceso químico que altera la estructura inicial de la biomasa solubilizando la lignina y hemicelulosa, dando como resultado la exposición de la celulosa a las enzimas. Este proceso tiene la ventaja de que el amoníaco utilizado puede ser reutilizado; sin embargo, el largo tiempo del tratamiento, la alta concentración de la base y la formación de sales residuales en la biomasa se pueden considerar como desventajas del método. No obstante, los resultados obtenidos dependen únicamente de la biomasa utilizada y las condiciones bajo las cuales se emplea el proceso, como la concentración, temperatura y tiempo (Akus-Szylberg et al., 2021).

Al ser un pretratamiento de deslignificación en condiciones alcalinas se pueden emplear bajas temperaturas y presión atmosférica por periodos de tiempo prolongados o bien, temperaturas y presiones más severas por periodos de tiempo más cortos. Es una técnica que solubiliza la lignina permitiendo separar la fase fermentable de la no fermentable del material

lignocelulósico, mientras rompe la rigidez de la estructura lo que permite un mejor acceso a la celulosa y hemicelulosa en la etapa de hidrólisis (Gómez et al., 2013).

#### *2.2.4.2. Tratamiento con ácido diluido*

Este tipo de pretratamientos se realiza generalmente con soluciones diluidas a bajas y altas temperaturas principalmente con ácidos como clorhídrico y sulfúrico, sin embargo, se emplean otros ácidos como el fluorhídrico, nítrico, fosfórico y ácidos orgánicos, entre otros (Vale, et al., 2021).

El pretratamiento con ácido diluido tiene como objetivo transformar las cadenas polisacáridas presentes en la biomasa lignocelulósica en monómeros más simples, esto con el fin de solubilizar la hemicelulosa. La biomasa que es sometida a este pretratamiento presenta un aumento en el volumen del poro de la pared, el tamaño y área superficial, lo cual influye en la accesibilidad de la celulosa a la celulosa durante la etapa de hidrólisis enzimática (Forero, 2018).

La utilización de tratamientos con ácido puede producir grandes cantidades de residuos neutralizantes, que se vuelen difíciles de reciclar y muy corrosivos. Sin embargo, el tratamiento con ácido diluido previene la degradación del azúcar (Vale, et al., 2021).

### **3. METODOLOGÍA**

Para la realización del estudio del uso del rastrojo de piña para la producción de etanol bajo el concepto de biorrefinería, se evaluará el aprovechamiento de la fase sólida mediante el pretratamiento tipo SAA con el fin de mejorar el rendimiento en la producción de etanol. El estudio incluye la utilización de las hojas de la planta (H) y una mezcla de hojas y tallo (HT) para determinar el impacto de SAA en la cantidad de carbohidratos estructurales, evaluando

los parámetros de temperatura, tiempos de residencia y concentración sólido/líquido que permitan determinar las mejores condiciones para obtener azúcares fermentables. Adicionalmente, se incluye una evaluación técnica y económica para evaluar la factibilidad para integrar el tratamiento al proceso de biorrefinería.

Como se observa en la Figura 1 (sección 1.2) la investigación se centra en la integración del proceso SAA en una biorrefinería previamente establecida. Se determinó el porcentaje de celulosa y hemicelulosa disponible en la biomasa antes y después del pretratamiento como indicador de la severidad del pretratamiento SAA. De las secciones 3.1 a 3.3 se detallan los procesos realizados para cada uno de los objetivos del trabajo final de graduación.

### *3.1. Caracterización de la biomasa del rastrojo de piña*

El rastrojo de piña utilizado para los experimentos fue recolectado en las plantaciones de la empresa empacadora Bella Vista, la cual se encuentra ubicada en Cutris de San Carlos (coordenadas 10°34'4.588"N 84°25'7.903"W). El rastrojo recolectado se trasladó al Ingenio Quebrada Azul, en Florencia de San Carlos (coordenadas 10°23'44.052"N 84°28'27.412"W) para su procesamiento. Se pesaron aleatoriamente 69 plantas listas para derribar, se recolectaron en el campo, se limpiaron las plantas para eliminar los residuos de suelo atrapados en la raíz y se pesaron las plantas para determinar el peso promedio del rastrojo de piña.

Posteriormente, se separaron las hojas de los tallos y se desfibraron (en molino de cuchillas y de martillos a 3800 rpm) para posteriormente molerlo y extraer la mayor cantidad de jugo posible, utilizando un molino cañero adaptado para trabajar con este material (Figura 5), el rastrojo se pasó dos veces por el molino. Este molino consiste en una trituración mecánica,

la cual se da por el arreglo de tres rodillos giratorios que se encargan de triturar el rastrojo para extraer el jugo.



**Figura 5.** Molino adaptado para moler el rastrojo de piña desfibrado

Para el experimento, se tomaron muestras de las hojas y del tallo de la planta en campo, así como hojas y tallo desfibrado y molido; y el jugo extraído del sistema de molienda. El material procesado en la molienda se trasladó al Laboratorio de Bioenergía de la Universidad de Costa Rica. El primer paso fue un secado a 60 °C durante 24 horas en un horno de convección forzada, posterior al secado se cortó y tamizó el rastrojo con el fin de obtener partículas menores a 2 mm y mayores a 0,5 mm, con el fin de estandarizar la muestra según lo recomienda la norma 42618 del Laboratorio de Energías Renovables de los Estados Unidos (NREL por sus siglas en inglés) (Sluiter, et al., 2012).

Para cada una de las muestras, se realizaron pruebas de sólidos totales y volátiles, siguiendo la metodología APHA, sección 2540 (Ricer, et al., 2017) (en el anexo A se muestra el resumen y las ecuaciones correspondientes a la norma).

Adicionalmente, para la fase sólida obtenida del sistema de molienda, se realizaron pruebas para la determinación de los carbohidratos estructurales, siguiendo la norma 42618 del NREL (Sluiter, et al., 2012). El proceso de caracterización de la biomasa se resume en el diagrama de la Figura 6.

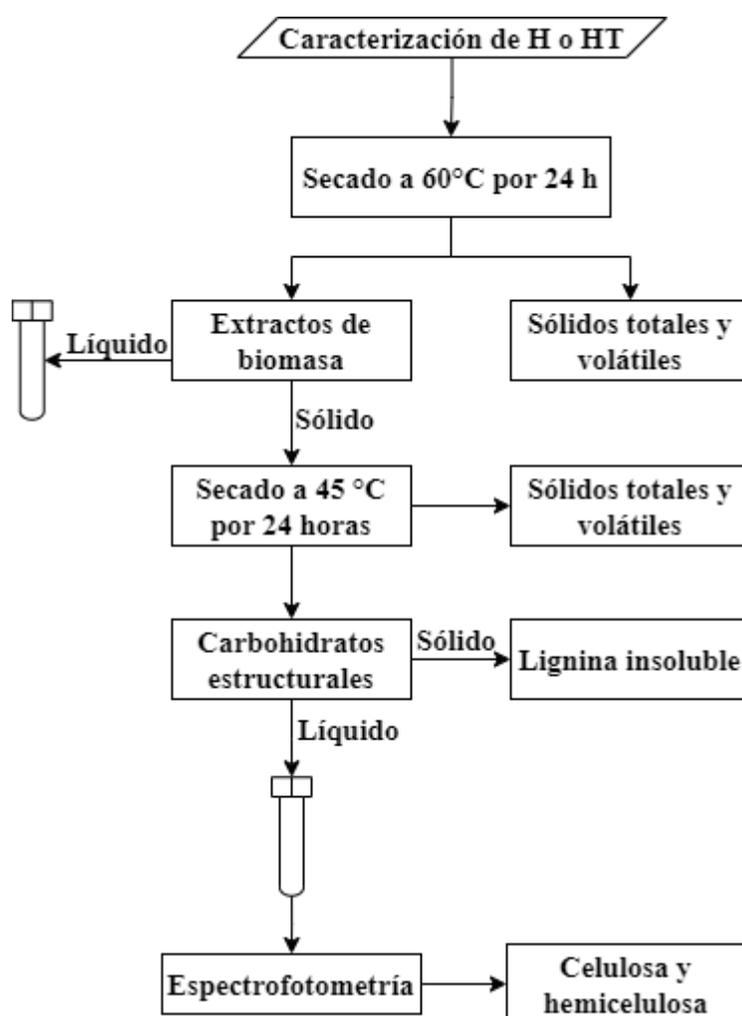


Figura 6. Diagrama de pruebas para caracterización de biomasa

Para las muestras de HT, Hernández y Prado (2018) establecieron en su estudio que el rastrojo de piña está compuesto por 85% hoja y 15% tallo, por lo que se utilizó esta proporción para hacer la mezcla.

Todas las muestras se analizaron por triplicado, reportando un promedio entre ellas y se calculó el porcentaje de diferencia entre las muestras con la ecuación (2). El error estadístico estándar de todos los análisis debe de ser menor a 10% para que se considere aceptable.

$$\% Error = \frac{\left(\frac{\sigma}{\sqrt{n}}\right)}{\bar{x}} \quad (2)$$

Donde  $n$  corresponde a la cantidad de muestras realizadas por cada tratamiento,  $\sigma$  corresponde a la desviación estándar y  $\bar{x}$  es el promedio de las muestras.

Posterior al cálculo de ST, SV y CH, se realizó el proceso de extracción en la biomasa basado en la norma 42619 del Laboratorio de Energías Renovables de Estados Unidos (NREL por sus siglas en inglés) (Sluiter, et al., 2005), el proceso se realizó en un extractor de fibra curada, el cual cuenta con capacidad para trabajar con 6 muestras, para ello se colocaron aproximadamente 0,8 g de masa seca por cada muestra y 100 mL de agua destilada hirviendo a presión atmosférica por dos horas, transcurrido el tiempo se filtró la muestra para extraer toda el agua y se colocaron 100 mL de alcohol etílico hirviendo a presión atmosférica por otras 2 horas (Figura 7).



**Figura 7.** Extractor de fibra cruda con muestras de hoja y tratamiento con alcohol etílico

Transcurrido el tiempo se filtró la muestra para extraer la mayor cantidad de alcohol posible.

Las muestras sólidas (masa sin extraíbles) se llevaron al horno a secar a 45 °C por 24 horas.

A la masa sin extraíbles se le determinó el contenido de azúcar en la matriz celular tanto H, como la HT, esto se realizó mediante la metodología propuesta por el laboratorio NREL (Norma 42618). Para el proceso de carbohidratos estructurales se colocaron 0,3 g de muestra seca sin extraíbles en un tubo de alta presión, junto con 3 mL de ácido sulfúrico al 72%, esto se colocó en baño María por 1 hora a 30 °C, agitando cada 10 minutos, posteriormente se diluyó el ácido al 4% añadiendo 84 g de agua destilada. Se taparon los tubos, se agitaron y se llevaron a la autoclave por 60 minutos a 121 °C, finalizado el ciclo se filtró al vacío, y de la muestra líquida obtenida se reservaron 50 mL para realizar los análisis de espectrofotometría.

La muestra sólida que quedó en el crisol se lavó con agua destilada y nuevamente se filtró al vacío para determinar la cantidad de lignina insoluble (LI) en la muestra, según las ecuaciones (3) y (4)

$$ODW = \frac{m_i \cdot \%ST}{100} \quad (3)$$

$$\% LI = \frac{(A - B) - (C - B)}{ODW} \cdot 100 \quad (4)$$

Donde ODW es masa seca en el horno,  $m_i$  es la masa inicial de la muestra (g), %ST es porcentaje de sólidos totales en la muestra,  $A$  es la masa residual de la muestra luego del secado a 105 °C + masa del crisol (g),  $B$  es la masa del crisol (g), y  $C$  es la masa residual de la muestra después del secado a 550 °C + la masa del crisol (g). Todas las masas fueron obtenidas en balanza analítica con una resolución de 0,0001 g

Para realizar las pruebas de carbohidratos estructurales según la norma, se utilizó el espectrofotómetro modelo T70+UV/VIS marca PG Instruments. El blanco de espectrofotometría fue realizado con agua destilada. Se midió la absorbancia con una longitud de onda de 320 nm y se diluyó lo necesario para obtener valores de absorbancia entre 0,7 y 1. Una vez determinada la absorbancia de las muestras se determinó el porcentaje de lignina soluble (LS) en las muestras con la ecuación (5).

$$LS = \frac{UVabs \cdot V \cdot FD}{\varepsilon \cdot ODW \cdot L} \cdot 100 \quad (5)$$

Donde  $V$  es volumen de filtrado (86,73 mL),  $\varepsilon$  es la absortividad molar (30000 mL/g·cm) ya que usó una longitud de onda de 320 nm,  $L$  es la longitud de cubeta (1 cm),  $FD$  el factor de

dilución, y UVabs es la absorbancia promedio de la muestra según la longitud de onda aplicada.

Finalmente, se determinó el porcentaje de celulosa y hemicelulosa %(C+H) que contenía el material esto por medio de la siguiente ecuación (6).

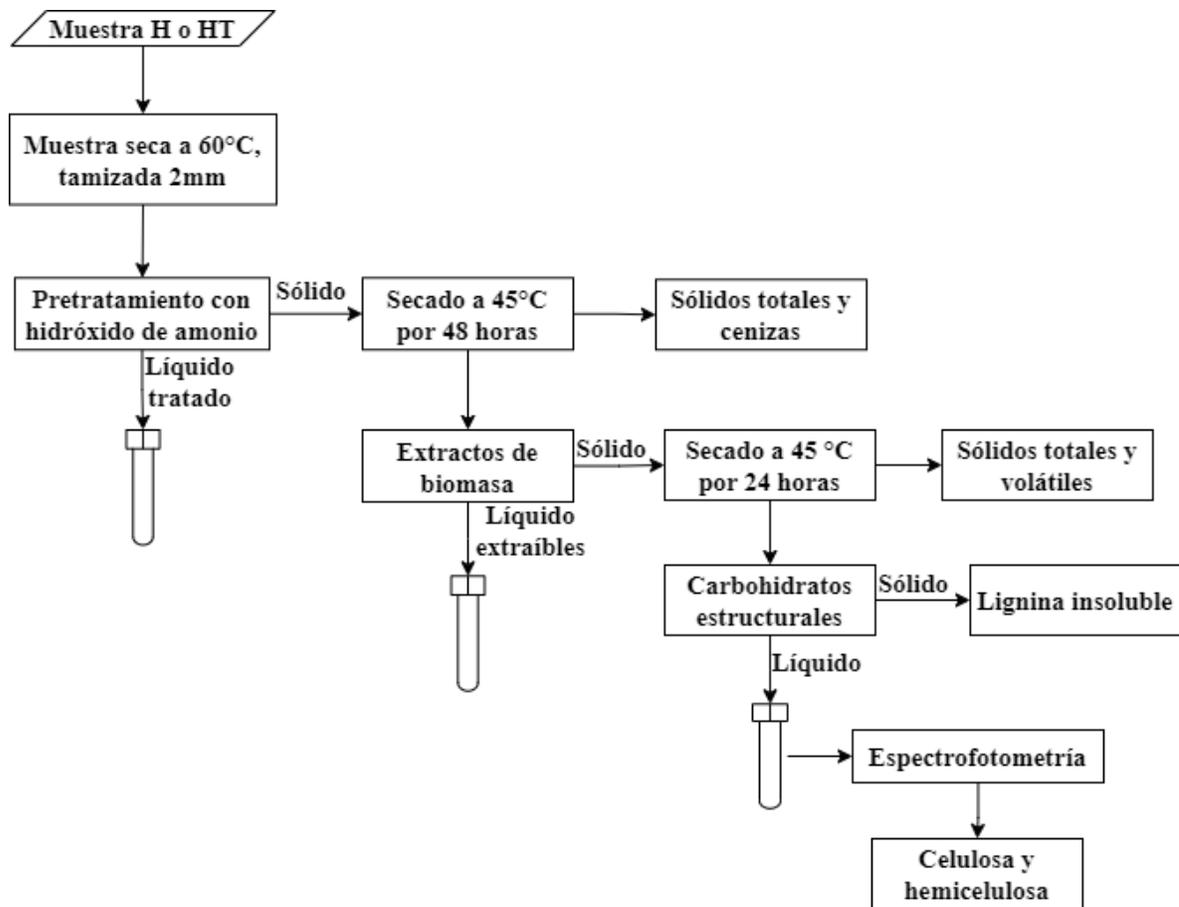
$$\%(C + H) = \%SV - \%LS - \%LI \quad (6)$$

Donde %SV es el porcentaje de sólidos volátiles, %LS es el porcentaje de lignina soluble y %LI es porcentaje de lignina insoluble.

Finalmente, para evaluar visualmente el cambio en la estructura de la hoja y el tallo se realizaron imágenes de microscopía electrónica, estas imágenes se realizaron en el Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMic) de la Universidad de Costa Rica, se utilizó la técnica de microscopía de barrido, y se empleó un microscopio de barrido marca Zeiss modelo Sigma 300.

### *3.2. Evaluación para establecer el mejor tratamiento de SAA*

Para evaluar el efecto del tratamiento SAA, se utilizó biomasa (H y HT) sin extraíbles. La Figura 8 muestra un diagrama de proceso para evaluar los diferentes parámetros involucrados en los tratamientos.



**Figura 8.** Diagrama de procesos para realizar pretratamiento SAA

En tubos de alta presión se colocaron 2 gramos aproximadamente de la muestra H o HT seco y tamizado, y se les agregó el hidróxido de amonio con una pureza del 99,5%. La cantidad de hidróxido de amonio se determinó según el estudio realizado por Himmelsbach (2009) donde se recomienda una relación de 1:5 (kilogramos de masa sólida seca:litro de solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 29,5%). Para el presente estudio, dado que se utilizó hidróxido de amonio con una concentración del 25%, se necesitó una relación 1:6 para cumplir con lo establecido por Himmelsbach. Adicionalmente, se valoró una cantidad mayor hidróxido de amonio de 1:12 para evaluar los cambios que esto podría generar en el proceso. La Tabla 2 muestra los tratamientos estudiados con el tipo de biomasa empleada, la temperatura y tiempo de residencia del tratamiento y la relación biomasa/ $\text{NH}_4\text{OH}$ .

**Tabla 2.** Tratamientos aplicados a la biomasa según los diferentes parámetros evaluados

<b>Tratamiento</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Muestra de Biomasa</b>	<b>Tiempo de residencia (min)</b>	<b>Relación biomasa/NH<sub>4</sub>OH (kgST/L)</b>
T1H05R1	80	Hoja	5	1:6
T1H05R2	80	Hoja	5	1:12
T1H10R1	80	Hoja	10	1:6
T1H10R2	80	Hoja	10	1:12
T2H05R1	120	Hoja	5	1:6
T2H05R2	120	Hoja	5	1:12
T2H10R1	120	Hoja	10	1:6
T2H10R2	120	Hoja	10	1:12
T1M05R1	80	Mezcla	5	1:6
T1M05R2	80	Mezcla	5	1:12
T1M10R1	80	Mezcla	10	1:6
T1M10R2	80	Mezcla	10	1:12
T2M05R1	120	Mezcla	5	1:6
T2M05R2	120	Mezcla	5	1:12
T2M10R1	120	Mezcla	10	1:6
T2M10R2	120	Mezcla	10	1:12

Se colocó la masa en los tubos de alta presión y se puso la cantidad de solución de NH<sub>4</sub>OH al 25% correspondiente a cada tratamiento, se taparon completamente los tubos y se pusieron en la autoclave para el caso de la temperatura de 120 °C y en baño María para el caso de 80

°C ya sea por 5 o 10 minutos de acuerdo con el tratamiento, una vez transcurrido el ciclo se les colocaron 100 mL de agua destilada y se procedieron a filtrar al vacío las muestras. Se almacenaron 50 mL de líquido en refrigeración, mientras que la muestra sólida se lavó con agua destilada y se secó en el horno a 45 °C durante 48 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de secado se dividió la muestra, 0,5 g se utilizaron para realizar sólidos totales, sólidos volátiles y cenizas, y 0,8 g se utilizaron para determinar los extractos de la biomasa. Posteriormente, a la masa sin extraíbles se le realizó el proceso de carbohidratos estructurales para determinar la cantidad de azúcares estructurales en la matriz celular después del tratamiento. Finalmente se realizaron las pruebas de microscopía electrónica en la biomasa sólida después del tratamiento para evaluar visualmente el cambio en la estructura del rastrojo.

### *3.2.1. Pretratamiento con ácido diluido*

Se realizó un pretratamiento con ácido diluido para comparar con el SAA, siendo el tratamiento con ácido diluido de los más utilizados (ver sección 2.2.4.2). Se realizó el proceso de pretratamiento con ácido diluido basado en la metodología planteada por Murillo (2018).

En tubos de alta presión se colocaron aproximadamente 2 g de materia seca, y se agregaron 20 mL de ácido sulfúrico al 1% suministrado por la escuela de química de la Universidad de Costa Rica, se sellaron los tubos y se llevaron a la autoclave a 121 °C por 15 minutos, transcurrido el ciclo se agregaron 100 mL de agua destilada y se filtró al vacío, se almacenó la muestra líquida y la muestra sólida se llevó a secar al horno a 45 °C por 48 horas. Transcurrido ese tiempo se tomaron 0,8 g de muestra para realizar el proceso de extracción de biomasa, y al resto de muestra se le realizaron sólidos totales y volátiles. A la biomasa sin

extraíbles se le cuantificaron los carbohidratos estructurales para determinar la cantidad de celulosa y hemicelulosa presente en la muestra después del pretratamiento, la muestra líquida recuperada de los carbohidratos estructurales se le realizó la prueba de espectrofotometría. La muestra sólida después del tratamiento es llevada al CIEMic para realizar las pruebas de microscopía electrónica.

### *3.2.2. Análisis estadístico*

Se utilizó RStudio (versión 4.3.0) para el desarrollo del análisis estadístico de los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza de 4 factores, cada factor con 2 niveles, con una significancia del 5%. Posteriormente se realizó la validación del análisis de varianza a través de los supuestos de los residuales, para este caso se validó la normalidad y homogeneidad de la varianza.

Los supuestos de normalidad y homogeneidad se evaluaron a través de las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente, ambas pruebas con un nivel de significancia del 5%. Además, se evaluaron estos supuestos a través del método gráfico, esto con un gráfico de distribución para evaluar la normalidad de los residuos y un diagrama de cajas para evaluar la homogeneidad de la varianza.

Una vez que se determinaron los factores estadísticamente significativos se realizó una prueba de Tukey. Esta prueba permitió determinar los tratamientos significativamente diferentes, y así evaluar cuál de los tratamientos presentó los mejores resultados. El tratamiento con los mejores resultados es el que presente un menor porcentaje de celulosa y hemicelulosa en la biomasa residual, ya que esto indica que se extrajo la mayor cantidad de azúcares fermentables en el líquido después de aplicar el tratamiento.

### 3.3. Evaluación tecno-económica para integrar el proceso SAA

El análisis económico fijó un flujo de caja con un horizonte de evaluación de 10 años para determinar la viabilidad del proyecto. Además, se estudian los indicadores financieros de valor actual neto (VAN) y la tasa interna de retorno (TIR) para determinar la rentabilidad de la integración del proceso.

Se consideró para el estudio una utilización de rastrojo de piña proveniente de 2 hectáreas diarias, que en teoría corresponde a una finca de 1 460 hectáreas; esto para determinar la cantidad de rastrojo molido después del proceso de molienda. Esto se realizó por medio de y la medición de la masa de 69 plantas de piña listas para derribar, tomadas de manera aleatoria. La bibliografía permitió establecer la cantidad de plantas por hectárea, así como la masa máxima y mínima que puede alcanzar cada planta.

La evaluación tecno-económica del proceso SAA se inició con un balance de masa con la caracterización de las muestras de tallo y hoja entera sin moler, así como con la cantidad de sólido y líquido que presentan las muestras y considerando una eficiencia del molino tal que la fase sólida (bagazo) tiene un 50% de humedad. El balance de masa se realizó a partir de las ecuaciones (7), (8) y (9):

$$\%ST_{jugo} = \frac{m_{sólido\ jugo}}{m_{sólido\ jugo} + m_{agua\ jugo}} \quad (7)$$

$$\%ST_{bagazo} = \frac{m_{agua\ bagazo}}{m_{sólido\ inicial} - m_{sólido\ jugo} + m_{agua\ bagazo}} \quad (8)$$

$$m_{agua\ inicial} = m_{agua\ jugo} + m_{agua\ bagazo} \quad (9)$$

Donde  $\%ST_{jugo}$  es el porcentaje de sólidos totales en el jugo del rastrojo que se obtiene de la molienda,  $m_{sólido\ jugo}$  es la masa(g) de sólido en el jugo,  $m_{agua\ jugo}$  es la masa (g) de agua en el

jugo,  $\%ST_{\text{bagazo}}$  es el porcentaje de sólidos totales en el rastrojo molido,  $m_{\text{agua bagazo}}$  es la masa(g) de agua en el rastrojo molido,  $m_{\text{sólido inicial}}$  es la masa sólida (g) del rastrojo antes de molerlo y  $m_{\text{agua inicial}}$  es la masa de agua (g) del rastrojo antes de molerlo.

Se realizó una revisión bibliográfica para establecer las condiciones de los equipos requeridos para realizar el proceso SAA de manera industrial. Se determinan los equipos necesarios, así como la capacidad de cada uno.

#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

##### *4.1. Caracterización de la biomasa del rastrojo de piña*

Para realizar la caracterización inicial se tomaron muestras del rastrojo recién recolectado. Para el estudio se considera que las raíces son despreciables en la masa que conforma el rastrojo; además, dado que las raíces se encuentran cubiertas de tierra, en el proceso de limpieza del rastrojo, el uso de las raíces resulta poco práctico. Por tanto, se consideró solamente el uso del tallo y hojas como biomasa para el experimento. La Figura 9 muestra el rastrojo recolectado en campo para el proceso de biorrefinería.

En la figura se observa que el rastrojo está compuesto en su mayoría por hojas, mientras que las raíces se encuentran cargadas de residuos de suelo y que estas forman un pequeño porcentaje de la planta, además, se observa que el tallo es una estructura más densa. Hernández y Prado (2018), realizaron mediciones en campo de siete fincas diferentes para establecer las características del rastrojo, observaron que el rastrojo se compone de raíz, tallo, hijos secundarios y hojas, sin embargo, de esta evaluación determinaron que se pueden clasificar en dos grupos principales, tallo y hoja.



**Figura 9.** Rastrojo de piña recolectado en campo

La Tabla 3 muestra la caracterización de rastrojo recolectado en campo. Estas muestras se caracterizaron frescas, y posteriormente se realizó el proceso de molienda y se secaron a 60 °C para conservarlas a lo largo del experimento.

**Tabla 3.** Caracterización del rastrojo fresco recolectado en campo <sup>A</sup>

<b>Biomasa</b>	<b>Humedad (%)</b>	<b>Sólidos Totales (%)</b>
Jugo	94,35±0,06	5,65±0,06
Hoja	88,44±0,10	11,56±0,10
Tallo	81,95±2,49	18,05±2,49
Mezcla	87,47±0,46	12,53±0,46

<sup>A</sup>: Reporte del promedio de 3 réplicas y la desviación estándar de las réplicas

En la Tabla 3 se observa que la mezcla de 85% hoja y 15% tallo cuenta con una humedad de 87,47%, lo que implica un porcentaje de sólidos totales de 12,53%, esta mezcla representa la

caracterización del rastrojo fresco recolectado en campo. Los sólidos totales representan el porcentaje de la biomasa de la cual se pueden extraer los azúcares fermentables (ver Figura 4). Adicionalmente se determinó la cantidad de sólidos totales presentes en el jugo que extrae del rastrojo al molerlo, este porcentaje es del 5,65%. Por su parte, Liao et al, (2022) en su estudio (Tabla 1) determinó un porcentaje de sólidos totales para la hoja de 13,8%.

Las muestras molidas se secaron y después de realizado el proceso de secado y de estandarización de tamaño con el tamiz, se procedió la caracterización de las muestras para establecer los parámetros iniciales de los tratamientos. La Tabla 4 muestra la caracterización de las muestras secas.

**Tabla 4.** Caracterización de la biomasa molida, seca a 60 °C y estandarizada a 2 mm <sup>A</sup>

Biomasa	Humedad (%)	Sólidos Totales (%)	Sólidos		Celulosa y
			Volátiles (%)	Lignina (%)	hemicelulosa (%)
Hoja	6,99±0,05	93,01±0,05	89,22±0,03	18,60±0,89	70,62±0,92
Mezcla	7,37±0,13	92,63±0,13	88,49±0,09	16,68±0,59	71,81±0,65

<sup>A</sup>: Reporte del promedio de 3 réplicas y la desviación estándar de las replicas

En la Tabla 4 se observa que el porcentaje de celulosa y hemicelulosa para la biomasa inicial sin aplicar ningún tratamiento es cercano al 70%. Para determinar si existen diferencias entre las dos biombras se realizó un análisis estadístico mediante una prueba de Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad de los residuos. Se obtuvo un valor de p igual a 0,71, lo cual indica que los residuos de los datos son normales; además, se realizó la prueba de Levene para comprobar la homogeneidad de la varianza de los datos, obteniéndose un p valor de 0,66 lo cual indica que los datos son homogéneos.

Una vez comprobada la normalidad y homocedasticidad, se realizó el análisis de varianza a los datos para determinar si hay diferencia significativa en el porcentaje de celulosa y hemicelulosa según la muestra de biomasa, donde se obtuvo un valor de p de 0,14 por lo tanto se determinó que estadísticamente no hay diferencia significativa entre el porcentaje de celulosa y hemicelulosa presente en la hoja y la mezcla de hoja-tallo.

Dado que el porcentaje de celulosa y hemicelulosa de la mezcla tallo-hoja es de 71,81% en base seca se puede estimar que por cada kg de rastrojo molido se tienen 0,36 kg de celulosa y hemicelulosa. Según el NREL, norma 32438 (Aden, et al., 2002), la celulosa y hemicelulosa tiene un rendimiento de conversión en etanol del 90% sobre la masa seca, lo que significa que se podrían obtener 0,32 kg de etanol por cada kilogramo de rastrojo molido que ingresa al proceso SAA en la biorrefinería.

Para el balance de masa, se determinó la cantidad de biomasa disponible por hectárea de siembra, esto permite conocer el flujo de rastrojo que se debe procesar diariamente. En la Tabla 5 se muestran los datos recolectados para la estimación.

**Tabla 5.** Medición de masa del rastrojo previo al derribo

Muestra	Hilera de siembra <sup>A</sup>		
	1	3	5
Planta 1	2,60	2,50	5,50
Planta 2	5,00	4,50	4,50
Planta 3	4,50	4,50	2,00
Planta 4	6,00	2,50	3,50
Planta 5	3,20	5,50	4,50
Planta 6	6,50	1,50	3,50

**Tabla 5.** Continuación

<b>Muestra</b>	<b>Hilera de siembra <sup>A</sup></b>		
	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>5</b>
Planta 7	5,50	6,50	5,50
Planta 8	4,50	3,50	1,50
Planta 9	4,00	1,50	5,50
Planta 10	8,00	3,50	3,50
Planta 11	7,50	2,50	7,50
Planta 12	3,00	2,50	3,50
Planta 13	4,70	2,50	6,50
Planta 14	6,50	2,50	6,00
Planta 15	5,50	3,50	4,50
Planta 16	4,50	1,50	4,50
Planta 17	5,50	2,50	1,50
Planta 18	1,50	4,50	2,00
Planta 19	2,50	6,50	3,50
Planta 20	3,50	1,50	3,50
Planta 21	1,50	4,50	3,50
Planta 22	2,00	2,50	1,50
Planta 23	5,50	1,50	3,50

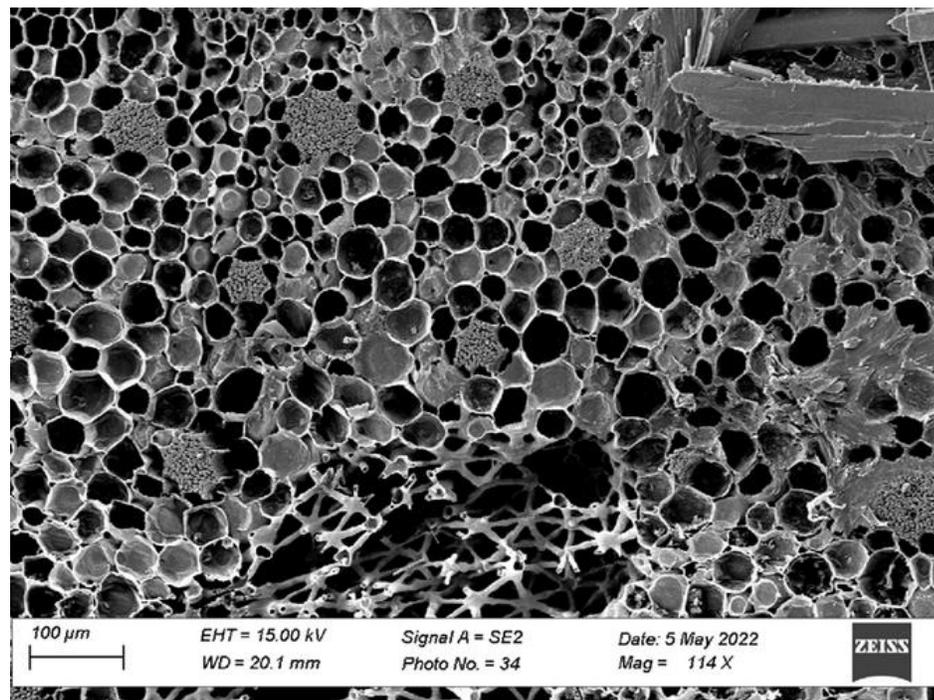
<sup>A</sup>: Según la técnica de cultivo; la piña se siembra en hileras con una distancia de entre hileras de 0,80-1 m y entre plantas de 0,3-0,40 m, siendo la hilera 1 la que está en el borde del lote.

De la Tabla 5 se observan valores que van desde 1,5 kg hasta 8,0 kg dando un promedio de 3,70 kg por planta, este valor se establece como masa máxima del rastrojo, Vargas et. al,

(2018), establecen una densidad de siembra de 62 000 a 75 000 plantas por hectárea, con una masa aproximada de 2,5 kg por planta, el cual se establece como masa mínima del rastrojo. Con estos datos se determinó que la producción mínima de rastrojo por hectárea es de 163 ton/ha y una producción máxima de 280 ton/ha. Con base en estos resultados se determina un promedio de 222 ton/ha.

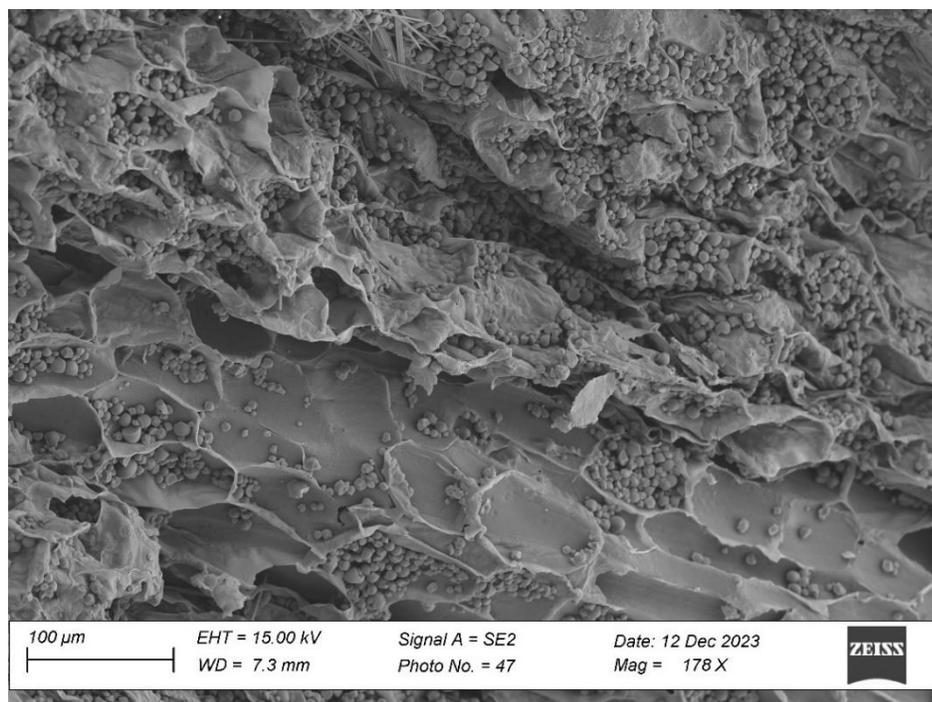
Dado que se estima un promedio de 222 ton/ha de rastrojo de piña, y basado en el estudio realizado por (Aden, et al., 2002), se determina que por cada hectárea de rastrojo para cosechar se pueden obtener hasta 19,97 ton de celulosa y hemicelulosa, las cuales con el rendimiento teórico de 90% se pueden transformar en 17,97 ton de etanol por hectárea.

Para analizar el daño que sufre la biomasa al aplicar los tratamientos se tomaron imágenes de microscopía electrónica para evaluar los cambios que se dieron. Se evaluaron muestras de la hoja y el tallo que se seca a 60 °C sin aplicar tratamiento. La imagen de la microscopía electrónica de la hoja antes del tratamiento se presenta en la Figura 10.



**Figura 10.** Microscopía electrónica a 100  $\mu$ m de la hoja antes del tratamiento

En la estructura de la hoja antes del tratamiento se observa una forma bien definida de la pared vegetal de la planta. En la Figura 11 se observa la estructura del tallo antes del tratamiento.



**Figura 11.** Microscopia electrónica a 100 µm de tallo seco sin tratamiento

En el tallo al igual que la hoja sin tratar se observa una estructura bien definida, donde la pared celular recubre y protege los azúcares.

#### *4.2. Evaluación para establecer el mejor tratamiento SAA*

Se realizaron los tratamientos descritos en la Tabla 2 (Sección 3.2) y posteriormente se determinaron los contenidos de sólidos totales, sólidos volátiles, lignina soluble e insoluble, celulosa y hemicelulosa de la fibra sólida remanente; siendo el contenido de celulosa y hemicelulosa la principal variable de interés. Estos valores se determinaron considerando el

porcentaje de reducción de biomasa que se dio durante el pretratamiento, los valores obtenidos se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Caracterización de biomasa después del tratamiento SAA <sup>A</sup>

Tratamiento	Sólidos		Lignina (%)	Celulosa y hemicelulosa (%)
	Totales (%)	Volátiles (%)		
T1H05R1	64,61±0,23	62,58±0,13	7,71±0,30	54,88±0,24
T1H05R2	63,67±0,24	62,00±0,24	7,32±0,22	54,68±0,46
T1H10R1	61,31±0,30	59,41±0,28	8,11±0,06	51,31±0,32
T1H10R2	60,69±0,05	58,89±0,14	7,90±0,36	50,99±0,24
T2H05R1	59,03±0,19	57,54±0,19	7,37±0,46	50,17±0,41
T2H05R2	57,51±0,40	56,11±0,70	7,46±0,28	48,66±0,55
T2H10R1	59,97±1,32	58,00±1,23	8,22±0,25	49,78±0,98
T2H10R2	57,92±1,42	55,46±2,18	8,50±0,20	46,95±1,99
T1M05R1	61,25±0,18	59,24±0,37	8,56±0,05	50,69±0,42
T1M05R2	62,20±1,48	60,19±1,43	8,87±0,41	51,32±1,19
T1M10R1	63,34±0,94	61,45±0,84	9,91±0,35	51,53±0,67
T1M10R2	62,39±0,70	60,59±0,67	9,43±0,49	51,16±0,20
T2M05R1	59,42±0,52	57,89±0,37	8,43±0,02	49,46±0,36
T2M05R2	59,26±0,70	57,47±0,60	7,12±0,06	50,35±0,62
T2M10R1	58,95±0,35	57,11±0,30	8,17±0,42	48,95±0,70
T2M10R2	55,91±0,56	54,01±0,52	6,75±0,45	47,26±0,09

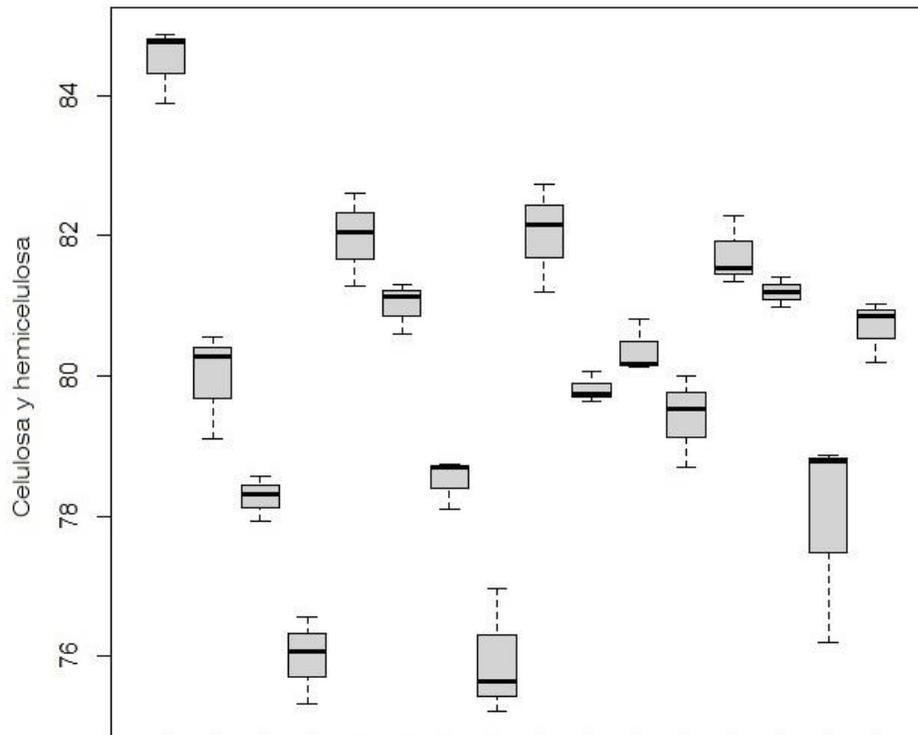
<sup>A</sup> Reporte del promedio de 3 réplicas y una desviación estándar

En la Tabla 6 se observa el porcentaje de sólidos totales obtenidos en la masa residual después de aplicar el tratamiento, donde se obtiene un mínimo de 55,91% y un valor máximo de

64,61%, a partir de los sólidos totales se puede obtener el porcentaje de sólidos volátiles y el porcentaje de lignina (soluble e insoluble). Con estos parámetros es posible determinar el porcentaje de celulosa y hemicelulosa, el cual presentó un porcentaje máximo de 54,88 para el tratamiento T1H05R1, y un porcentaje mínimo de 46,95 para el tratamiento T2H10R2. Por su parte, Himmelsbach (2009), obtuvo porcentajes de hasta 71% de celulosa y hemicelulosa después de aplicar el tratamiento SAA en condiciones similares a pasto varilla, aunque las condiciones del tratamiento son similares, se obtienen un mayor porcentaje de celulosa y hemicelulosa en el pasto varilla que el rastrojo de piña después de aplicado el tratamiento dada la diferencia en la biomasa.

Para determinar el tratamiento que presenta mejores resultados en términos de porcentaje de celulosa y hemicelulosa se realizaron pruebas estadísticas donde se evaluó el tratamiento que presente un porcentaje menor. Se busca el tratamiento con menor porcentaje de celulosa y hemicelulosa ya que se evalúa la masa residual después del tratamiento, por lo que un menor porcentaje en la biomasa residual indica un mayor desprendimiento de los azúcares durante el tratamiento. Además, indica mejor solubilización de la lignina y aumento del área superficial para que la hidrólisis enzimática tenga un mejor rendimiento.

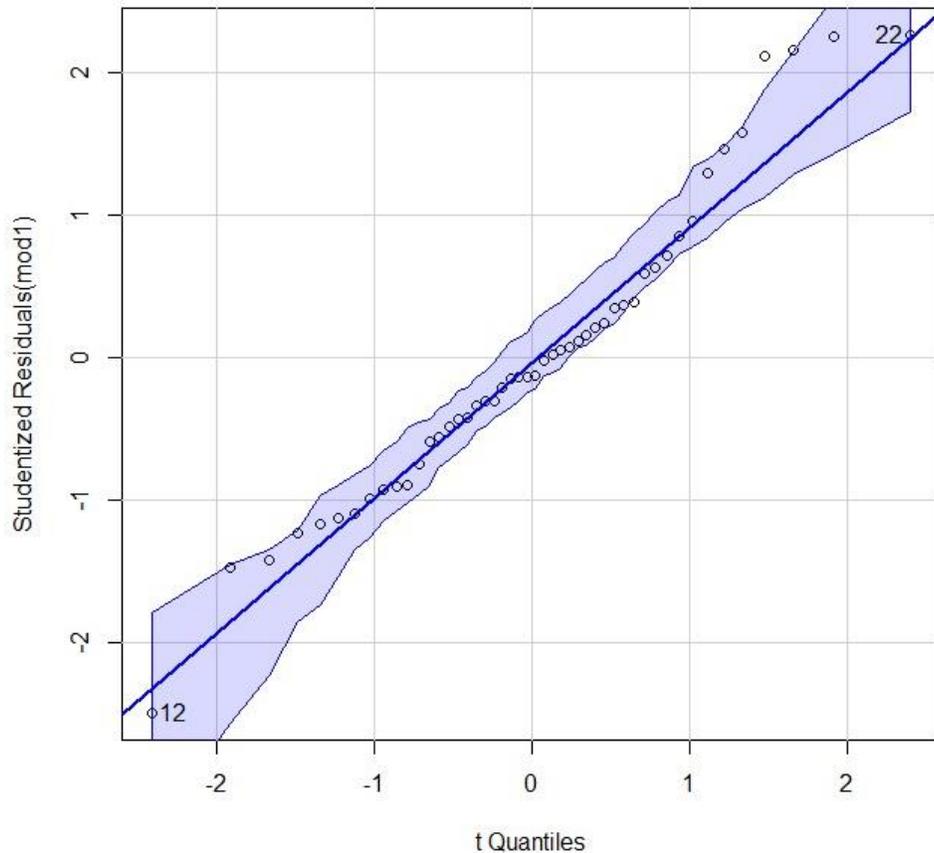
En la Figura 12 se presentan gráficamente los valores obtenidos de concentración de celulosa y hemicelulosa después del tratamiento SAA, con cajas para evaluar la homogeneidad de las varianzas de los datos para evaluar de manera visual.



**Figura 12.** Gráfica de cajas para evaluar la homogeneidad de las varianzas de todos los tratamientos

En la Figura 12 se observa el comportamiento de la varianza del porcentaje de celulosa y hemicelulosa de los tratamientos, cada caja representa la varianza de cada uno de los tratamientos SAA realizados. Se observa que algunos tratamientos presentan rangos más amplios que otros, sin embargo, no se aprecian rangos más amplios al 5%, por lo que los conjuntos de datos no presentan mucha variabilidad.

Gráficamente no es posible determinar el cumplimiento del supuesto de homogeneidad de la varianza, ya que se deberían observar todas las cajas alineadas de forma horizontal. Por lo que se realizó la prueba de Levene para determinar la homogeneidad de la varianza, donde se obtuvo un valor de  $p$  de 0,63, ya que este valor es mayor a 0,05 se puede decir con un 95% de confianza que los datos cumplen con el supuesto de homogeneidad de la varianza. También se realizó un estudio de normalidad los residuos (Figura 13).



**Figura 13.** Gráfico de normalidad de los residuos

Para el caso de la normalidad de los residuos se puede deducir que los datos sí cumplen con este supuesto ya que la mayoría de los puntos se encuentran dentro del área sombreada, lo que indica un rango aceptable. De igual forma, se realizó la prueba estadística de Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad de los residuos, en esta prueba se obtuvo un valor de  $p$  de 0,14 por lo que se confirma que cumple el supuesto.

Después de verificar los supuestos de normalidad y homogeneidad, se realizó el análisis de varianza de los datos obtenidos de celulosa y hemicelulosa, para determinar el tratamiento que presenta menor porcentaje en la biomasa sólida después del tratamiento, ya que si disminuye este porcentaje en la biomasa significa que el tratamiento extrajo mayor cantidad de azúcares que quedan en la fase líquida, mostrando una mayor severidad del tratamiento,

logrando azúcares en la fase líquida y permitiendo que la fase sólida tenga más área superficial y menos cantidad de lignina.

En la Tabla 7 se observa que no hay evidencia estadística con una significancia del 5% para decir que el tipo de muestra de biomasa (H y HT) afecta el porcentaje final de celulosa y hemicelulosa del tratamiento dado que presenta un p valor superior a 0,05, el mismo comportamiento se dio para la relación biomasa/NH<sub>4</sub>OH que se emplea; sin embargo, las variables de tiempo y temperatura sí son estadísticamente significativas para el porcentaje de celulosa y hemicelulosa al final del tratamiento de SAA ya que presentan un p valor muy inferior a 0,05.

**Tabla 7.** Resultados del análisis de varianza de los diferentes tratamientos aplicados

<b>Variable</b>	<b>p valor</b>	<b>Importancia</b>
Biomasa	0,19	-
Tiempo	$7,76 \times 10^{-5}$	***
Relación biomasa/NH <sub>4</sub> OH	0,06	-
Temperatura	$2,37 \times 10^{-11}$	***

\*\*\*muy significativa, \*\* significativa, \*poco significativa, - no es significativa

Dado que hay dos variables que afectan el porcentaje de azúcares se realizó una prueba de Tukey para determinar los tratamientos estadísticamente diferentes y así determinar el tratamiento que presentó menor cantidad de celulosa y hemicelulosa en el remanente sólido después del tratamiento SAA. En la Tabla 8 se muestran los resultados de la prueba Tukey realizada a los tratamientos.

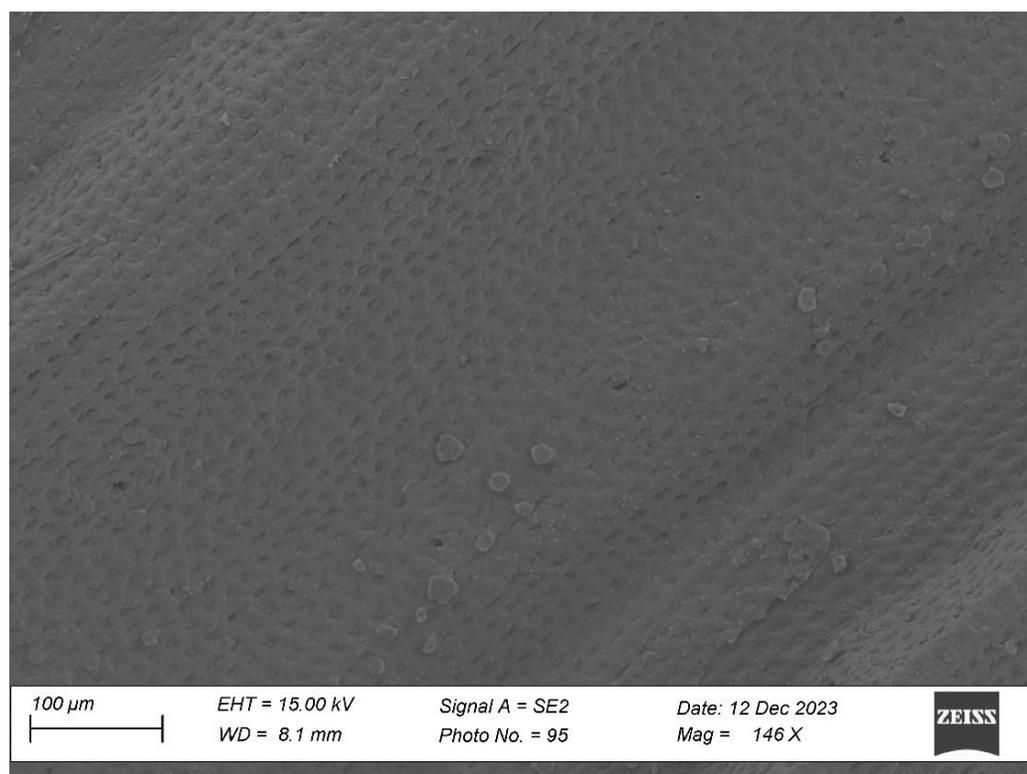
**Tabla 8.** Resultado de prueba Tukey para evaluar diferencia de tratamientos

<b>Tratamiento</b>	<b>Media (% de celulosa y hemicelulosa)</b>								
T2H10R2	46,97	A							
T2M10R2	47,26	A	B						
T2H05R2	48,66	A	B	C					
T2M10R1	48,95	A	B	C	D				
T2M05R1	49,46		B	C	D	E			
T2H10R1	49,78			C	D	E	F		
T2H05R1	50,17			C	D	E	F	G	
T2M05R2	50,35			C	D	E	F	G	
T1M05R1	50,71			C	D	E	F	G	
T1H10R2	50,77			C	D	E	F	G	
T1H10R1	50,98				D	E	F	G	
T1M10R2	51,39					E	F	G	
T1M10R1	51,86						F	G	H
T1M05R2	52,22							G	H
T1H05R2	53,77								H I
T1H05R1	54,85								I

Los tratamientos con una letra común no son significativamente diferentes La Tabla 8 muestra los porcentajes de celulosa y hemicelulosa ordenados de menor a mayor, los tratamientos que tienen letra en común no tienen estadísticamente diferencias significativas entre ellos, esto con un nivel de confianza del 95%. El modelo del análisis de varianza

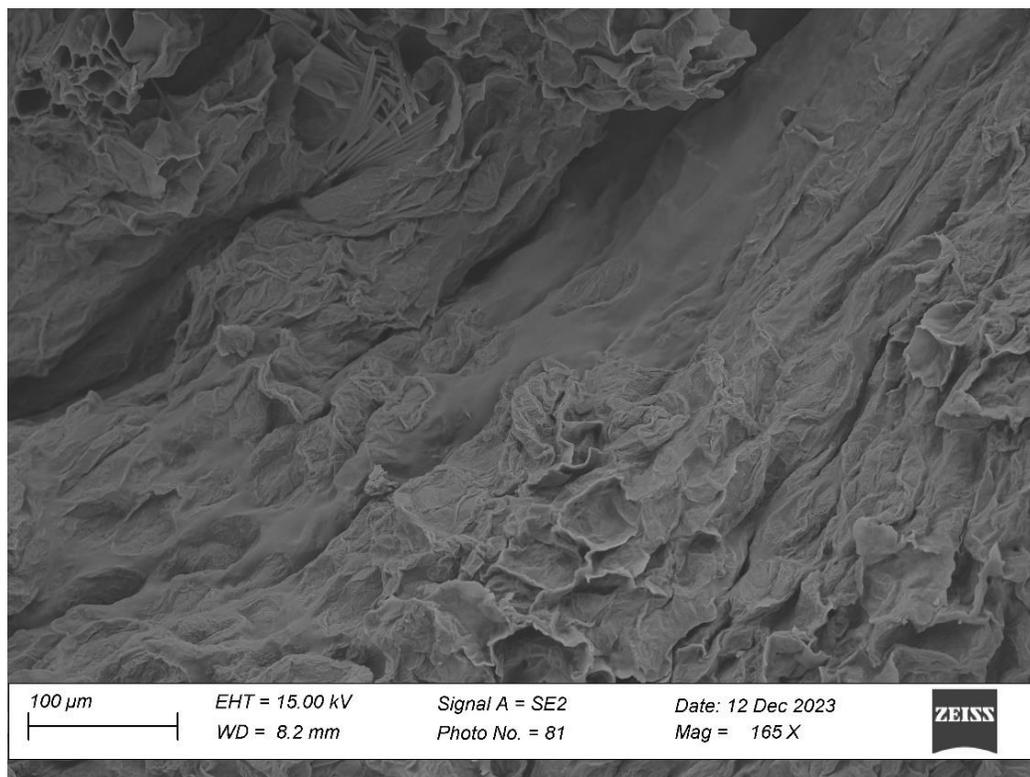
determinó que la temperatura de 120 °C es la que presenta el menor porcentaje de celulosa y hemicelulosa, al igual que el tiempo de residencia de 10 minutos. Dados los resultados de la prueba Tukey se determina que el mejor tratamiento es el T2M10R2: temperatura de 120 °C con biomasa tipo mezcla, tiempo de 10 min y la relación biomasa/NH<sub>4</sub>OH de 1:12.

Para evaluar el daño que se realizó en la estructura por el tratamiento se tomaron imágenes de microscopia electrónica al tallo y hoja tratados con hidróxido de amonio. Las muestras tratadas en SSA se secaron a 45 °C. En la Figura 14 se logra apreciar como el tratamiento extrajo gran parte de la estructura de la hoja, ya que en la hoja sin tratamiento (Figura 10) se aprecia gran cantidad de relieve en la superficie y una estructura más definida, mientras que la hoja tratada con NH<sub>4</sub>OH se aprecia una superficie mucho más lisa y sin tantos relieves.



**Figura 14.** Microscopia electrónica a 100  $\mu$ m de hoja tratada con hidróxido de amonio

En la hoja tratada con hidróxido de amonio se observa una estructura más simple, con menos lignina, lo que la convierte en un material más fácil de procesar con las enzimas. En la Figura 15 se observa que las estructuras que se encontraban adheridas a la superficie del tallo al parecer fueron removidas por el tratamiento. Además, se puede apreciar que la estructura del tallo ya no tiene una forma tan definida, ahora se observa una estructura holgada y poco rígida.



**Figura 15.** Microscopia electrónica a 100  $\mu\text{m}$  de tallo tratado con hidróxido de amonio

Por otra parte, en el tallo tratado con hidróxido de amonio se observa una estructura sin soporte estructural en comparación el tallo sin tratar (Figura 11). Un soporte estructural definido es típico de los tallos con altas cantidades de lignina.

#### 4.2.2 Comparación con tratamiento con ácido diluido

Adicionalmente para evaluar el rendimiento del SAA, se realizó el proceso con ácido sulfúrico diluido como comparación, se comparó el rendimiento de extracción de azúcares fermentables del ácido diluido con el rendimiento presentado por el mejor tratamiento SAA, para esto se midieron las mismas variables. Para el tratamiento con ácido diluido se empleó un tiempo de 15 minutos, con una temperatura de 121°C y una relación de 1:10 de biomasa/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se busca comparar el rendimiento del SAA con el del ácido diluido ya que este último que se emplea comúnmente para este tipo de procedimientos.

Con el tratamiento con ácido diluido se obtuvo un porcentaje de celulosa y hemicelulosa cercano al 35% (Tabla 9). Se realizó el análisis de varianza para determinar si existe diferencia significativa entre la biomasa, se realizaron los supuestos de homogeneidad de la varianza y normalidad de los residuos, donde se obtuvieron valores de p de 0,74 y 0,41 respectivamente, lo cual indica que cumple con los supuestos.

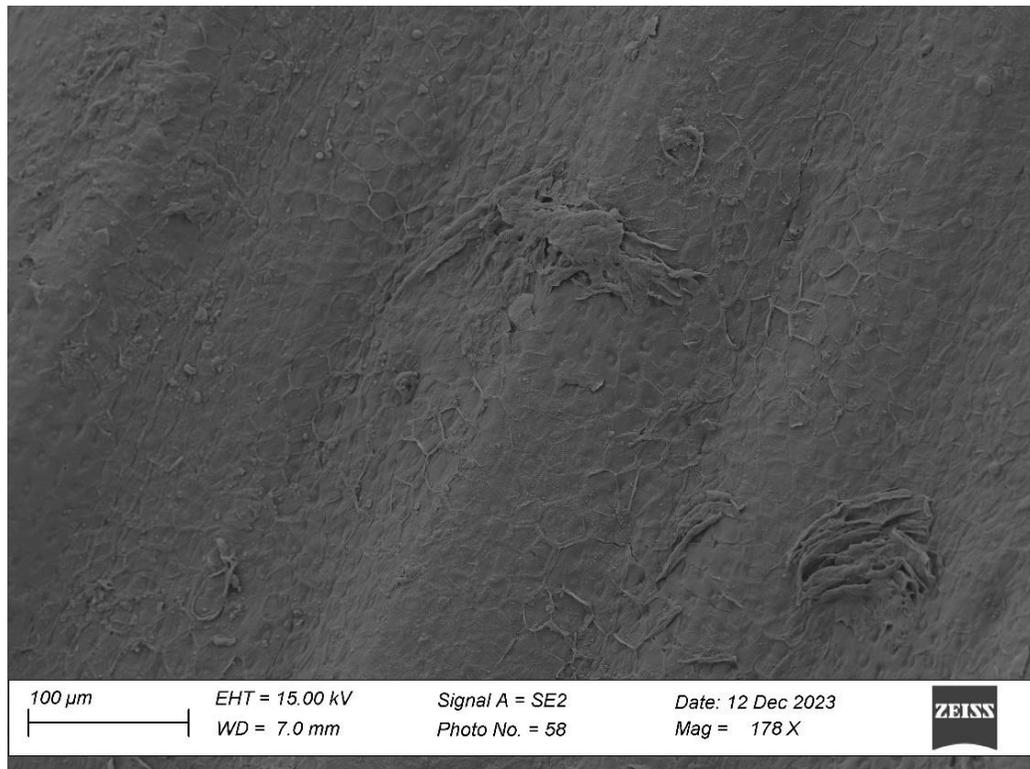
**Tabla 9.** Caracterización de la biomasa después del tratamiento con ácido diluido <sup>A</sup>

<b>Biomasa</b>	<b>Sólidos Totales (%)</b>	<b>Sólidos Volátiles (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Celulosa y hemicelulosa (%)</b>
Hoja	51,50±0,64	50,44±0,62	13,69±0,20	36,75±0,81
Mezcla	46,57±0,27	45,69±0,19	12,13±0,25	33,55±0,32

<sup>A</sup>: Reporte del promedio de 3 réplicas y una desviación estándar

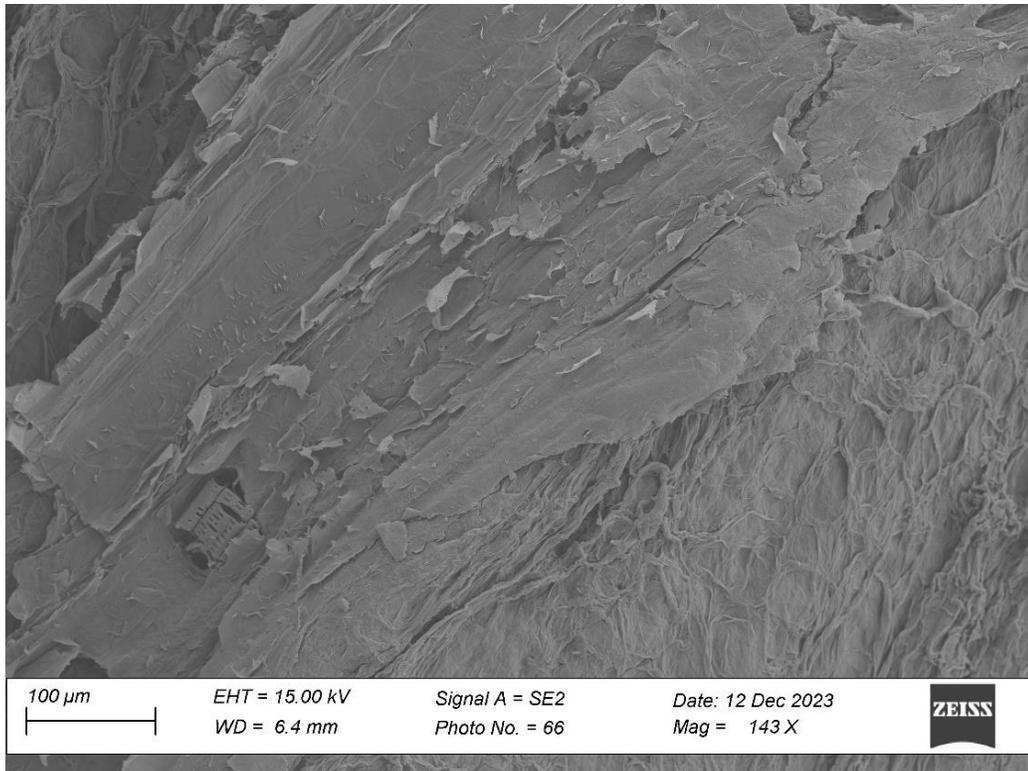
Para el análisis de varianza se obtuvo un valor de p de 0,003, por lo que se concluye que estadísticamente el tipo de biomasa sí afecta significativamente el porcentaje de celulosa y hemicelulosa. Por lo tanto, la biomasa que presenta el menor porcentaje de celulosa y hemicelulosa es el más adecuado, en este caso es la biomasa tipo mezcla.

Para el ácido diluido también se realizaron imágenes con microscopia electrónica para evaluar el daño que se dio en la estructura del tallo y la hoja. En la Figura 16 se observa la estructura de la hoja tratada con ácido sulfúrico diluido al 1%. Se puede apreciar que el tratamiento fue más agresivo que el de hidróxido de amonio ya que se aprecia una estructura más lisa.



**Figura 16.** Microscopia electrónica a 100  $\mu\text{m}$  de hoja tratada con ácido diluido

En la Figura 17 se observa la estructura del tallo tratado con ácido diluido. Para este caso se puede observar que el tallo perdió rigidez y estructura al igual que en el caso del tratamiento SAA.



**Figura 17.** Microscopia electrónica a 100 μm de tallo tratada con ácido diluido

Tanto para el tratamiento con hidróxido de amonio como para el tratamiento con ácido sulfúrico, se obtuvo un menor porcentaje de celulosa y hemicelulosa con la biomasa de tipo mezcla. Además, se realizó un análisis estadístico entre ambos procedimientos para evaluar si existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Se realizaron las pruebas de normalidad de los residuos y de homogeneidad de la varianza, en ambas pruebas se obtuvieron valores de p mayores a 0,05, por lo que se cumplen los supuestos. Se realizó el análisis de varianza para determinar si hay diferencia significativa, dicho análisis muestra un valor de p de  $2,47 \times 10^{-7}$  lo cual indica que hay evidencia estadística para decir que el tipo de pretratamiento que se realizó afecta significativamente el porcentaje de celulosa y hemicelulosa presente en la biomasa después de tratada.

Dado que el tratamiento afecta significativamente el porcentaje de celulosa y hemicelulosa, se evalúa cuál de los dos tratamientos presenta un porcentaje menor. Se compara entre el tratamiento T2M10R2, el cual consiste en biomasa tipo mezcla, temperatura 120 °C, tiempo de 10 min y relación biomasa/NH<sub>4</sub>OH de 1:12, y el tratamiento de ácido sulfúrico diluido con biomasa tipo mezcla, temperatura 121 °C, tiempo de 15 min y relación biomasa/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:10. El tratamiento realizado con ácido diluido presenta el menor porcentaje de celulosa y hemicelulosa en la biomasa posterior al tratamiento, comparado con el tratamiento SAA; lo cual indica que el tratamiento con ácido diluido extrajo mayor cantidad de azúcares fermentables que el tratamiento SAA.

#### *4.3 Evaluación tecno-económica para integrar el proceso SAA*

El diseño de planta para la integración del proceso SAA al concepto de biorrefinería contempla la cantidad de masa de rastrojo que entra en el proceso después de la molienda (Figura 1). De la estimación realizada de la cantidad de toneladas métricas de rastrojo por hectárea sembrada se determinó un promedio de 222 ton/ha (Sección 4.1), dado que se contempla una planta de trabajo para dos hectáreas diarias, se consideran 444 ton/ha diarias de rastrojo fresco que entran al proceso de biorrefinería.

Para el balance de masa se utilizó la caracterización inicial presente en la Tabla 3 (sección 4.1) donde se realizó una caracterización del jugo que se obtuvo después de la molienda, y se caracterizó el rastrojo fresco que ingresa a la planta.

El balance de masa considera el tratamiento de 68,91 toneladas métricas de rastrojo molido por día. Del proceso de molienda se sabe que la masa del rastrojo molido está compuesta por 50% de sólidos totales y 50% de agua.

Se ha considerado la utilización del rastrojo molido en dos procesos, se utiliza un 40% del rastrojo se utiliza para dotar de energía térmica para el proceso de destilación de la biorrefinería, y el 60% restante se utiliza para realizar el proceso de tratamiento con SAA.

Se utiliza amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) para realizar el tratamiento, y se disuelve en agua para alcanzar una solución al 25% de hidróxido de amonio. El agua para diluciones y para lavar en la etapa de prensado proviene de la destilación etílica; no es necesario la incorporación de fuentes adicionales.

Se requieren 45 kg de amoníaco al día para tratar el 60% del rastrojo molido con una dilución de 25% que cumpla con la relación 1:12 (kg/L). Para realizar la dilución del amoníaco al 25% se deben colocar 186 m<sup>3</sup> de agua diarios, de los cuales 20,67 m<sup>3</sup> provienen del mismo rastrojo molido (aporte de agua de la misma biomasa a tratar).

Para el tratamiento se requiere una temperatura de 120 °C durante 10 minutos, esto se realiza en una autoclave construida en la planta, el cual consiste en un tanque de acero inoxidable tapado, que resiste la alta temperatura y presión. Esta autoclave se alimenta con el vapor de la caldera para alcanzar las altas temperaturas. Según Pérez, (2017), una autoclave industrial en máxima escala de producción tarda alrededor de 15 minutos en la etapa de precalentamiento, por lo que se consideran ciclos de 1 hora para el proceso. Estos ciclos contemplan el tiempo de carga y descarga de la autoclave, el precalentamiento y enfriamiento, así como el tiempo del proceso. Se consideran 10 minutos como tiempo de carga y descarga, 15 minutos de enfriamiento y precalentamiento y 10 minutos de tratamiento. Bajo estas condiciones se establece un tiempo de 18 horas de trabajo y 4 horas de limpieza y mantenimiento, por lo que las 68,91 toneladas diarias se procesan en 18 ciclos de 1 hora cada uno.



mismos equipos dado que las condiciones son similares, sin embargo, no es una planta versátil para ambos procesos, en caso de que se deseen realizar ambos procesos se deben construir dos plantas similares. Par el proceso de ácido diluido se requiere de una temperatura de 121°C, por un tiempo de 15 minutos, con una relación 1:10 (kg/L), a una concentración del 1% de ácido sulfúrico.

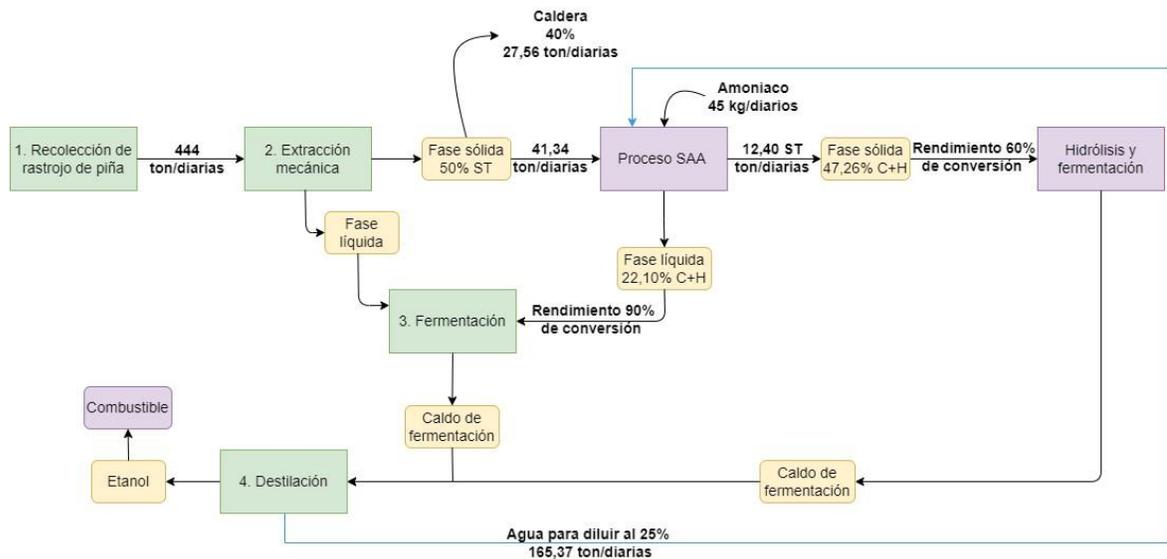
#### *4.3.1. Análisis económico*

Para el análisis económico, se determinó que el porcentaje de aumento de azúcares fermentables en el caldo de fermentación provenientes de la celulosa y hemicelulosa después de aplicar el mejor tratamiento, darán un ingreso económico adicional por conversión a bioetanol.

Con el porcentaje de azúcares fermentables extraídos por el tratamiento y el porcentaje de eficiencia de conversión de celulosa y hemicelulosa en etanol, se determina que por cada tonelada de rastrojo molido con un 50% de humedad que ingresa al tratamiento se producen 110 kg de etanol adicionales con el proceso SAA. Según el NREL, norma 32438 (Aden, et al., 2002), la celulosa y hemicelulosa tiene un rendimiento de conversión en etanol del 90% sobre la masa seca.

Adicionalmente, el rastrojo molido que sale del tratamiento SAA pasa al proceso de hidrólisis y fermentación, según Murillo (2018), el proceso conjunto de hidrólisis y fermentación tiene un rendimiento del 60% de conversión de celulosa y hemicelulosa en ciclos de 48 horas; adicionalmente, según el NREL en el documento técnico 32438 (Aden, et al., 2002) se debe emplear una carga de enzimas de 12 FPU/g celulosa. Por las pruebas realizadas en el laboratorio se determinó que hay una reducción de masa seca del 40% durante el proceso SAA, por lo que en este proceso se obtienen alrededor de 283 kg de etanol por cada tonelada

de masa seca que ingresa al proceso de hidrólisis. En la Figura 19 se muestran algunas de las consideraciones y la masa procesada en cada etapa del proceso de producción de etanol incorporando SAA a la biorrefinería.



**Figura 19.** Balance de masa de producción de etanol a partir de rastrojo de piña

Dado que el etanol se va a utilizar como un sustituto al combustible, se plantea el precio de etanol igual al precio de la gasolina tipo super en Costa Rica, al lunes 6 de mayo del 2024, con el tipo de cambio del dólar del mismo día, se establece un precio de USD 1,80 por kg de etanol.

Para el manejo de la planta se dispone de tres turnos diarios, por cada turno se requieren dos operadores de planta en condiciones semi calificado para realizar el tratamiento SAA. Según el Ministerio de Trabajo y Seguridad Social para el 2024 en Costa Rica, a un operario semicalificado le corresponde un salario de USD 25,40 por día, sin embargo, para el presente estudio se considera un salario de USD 38,10 diario. El costo por el personal administrativo y la mano de obra calificada no se considera en el presente análisis ya que se determina que este personal ya es parte de la biorrefinería.

Para la construcción del tanque donde se realiza el tratamiento dado la cantidad de masa que se debe procesar diariamente, se requieren tres tanques de acero inoxidable, cada tanque con una capacidad de 5 m<sup>3</sup>. Para agregar el hidróxido de amonio al tanque se utilizan bombas dosificadoras, una para cada tanque. Adicionalmente, para el proceso de hidrólisis y fermentación se requiere un tanque de 5 m<sup>3</sup> diario, dado que este proceso tarda 48 horas, se requieren 3 tanques para realizar este proceso diariamente. La Tabla 10 muestra las inversiones necesarias para implementar el pretratamiento en la biorrefinería.

**Tabla 10.** Inversiones iniciales para implementar el pretratamiento al concepto de biorrefinería

<i>Inversiones</i>			
Tanque acero inoxidable	3	\$ 15 820,00	\$ 47 460,00
Bomba centrífuga	1	\$ 423,11	\$ 423,11
Bomba dosificadora	3	\$ 853,20	\$ 2 559,60
Banda transportadora	3	\$ 2 783,56	\$ 8 350,67
Prensa de tornillo	1	\$ 34 368,00	\$ 34 368,00
Tanque de hidrólisis	3	\$ 15 820,00	\$ 47 460,00
<b>Total de inversión</b>			<b>\$ 140 621,38</b>

Para implementar el proceso SAA o ácido diluido a la planta de biorrefinería se requiere de una inversión inicial de 140 624,38 USD. Con estas consideraciones se realizó el flujo de caja para evaluar la rentabilidad de la implementación del tratamiento de la biomasa con amoniaco acuoso (Anexo B). En la Tabla 11 se observan las condiciones anuales tomadas para realizar el análisis financiero de la implementación del proceso SAA y estimar los indicadores financieros.

**Tabla 11.** Análisis financiero anual para la implementación del proceso SAA a una biorrefinería <sup>A</sup>

	<b>Cantidad diaria</b>	<b>Precio Unitario</b>	<b>Total anual</b>
<i>Ingresos</i>			
Etanol tratamiento SAA	4 567,41 kg	1,80 USD/kg	\$3 000 788,63
Etanol Hidrólisis	3 516,99 kg	1,80 USD/kg	\$2 310 661,85
<b>Ventas totales</b>			<b>\$ 5 311 450,48</b>
<i>Costos variables</i>			
Amonio	45,27 kg	1,50 USD/kg	\$ 24 785,83
Enzimas (100 000FPU) <sup>B</sup>	22,7	\$ 498,53	\$ 4 130 570,32
Servicios (Electricidad) <sup>C</sup>	1314kW	0,06 USD/kW	\$ 28 776,60
<b>Costos Variables Totales</b>			<b>\$ 4 184 132,74</b>
<i>Costos fijos</i>			
Salarios <sup>D</sup>	9	\$ 38,10	\$ 83 439,00
Mantenimiento equipos <sup>E</sup>			\$ 7 031,07
<b>Costos fijos totales</b>			<b>\$ 90 470,07</b>

<sup>A</sup> Los ingresos y costos están dados en la cantidad diaria que se requiere para el proceso, precio unitario y total anual

<sup>B</sup> Las enzimas se venden en recipientes de 100 000FPU, por lo que diariamente se requieren 22,7 recipientes que tienen un valor de 498.53 USD por recipiente

<sup>C</sup> Se estima el consumo energético diario de los equipos requeridos (Tabla 10) para implementar el pretratamiento

<sup>D</sup> Para los salarios se requieren 6 personas diariamente, las cuales tienen un costo de 38,10 USD por persona

<sup>E</sup> Para los costos de mantenimiento se considera un 5% de la inversión inicial.

En la Tabla 11 se observan ingresos anuales por producción de etanol de 5 311 450,48 USD, mientras que se reportan un total de costos variables de 4 184 132,74 USD/anuales, y un total de costos fijos de 90 470,07 USD por año. Dado el costo de inversión inicial y estimados los ingresos y costos relacionados al proceso SAA se realizó el análisis de flujo de caja.

Para este análisis se obtuvo una tasa interna de retorno de 24,34%, con un valor actual neto de \$3 708 931,45, esto con una tasa de oportunidad del 10%. Esto indica que el proyecto es viable económica, y que la inversión inicial genera retorno sobre la tasa de descuento, en un horizonte de evaluación de 10 años se obtiene el retorno de inversión a partir del sexto año.

Para el análisis económico del proceso con ácido sulfúrico diluido se consideran los mismos equipos por lo que el costo de inversión es el mismo (Tabla 10); sin embargo, cambia la cantidad de etanol producida y la cantidad de enzimas necesaria para realizar la hidrólisis esto debido a que se extrajo un mayor porcentaje de celulosa y hemicelulosa en este proceso. Considerando esto se realiza el análisis financiero para evaluar la rentabilidad de implementar el tratamiento con ácido diluido (Anexo C), en la Tabla 12 se observan las condiciones anuales tomadas para realizar el análisis financiero.

**Tabla 12.** Análisis financiero para la implementación del proceso ácido diluido a una biorrefinería<sup>A</sup>

	<b>Cantidad diaria</b>	<b>Precio Unitario</b>	<b>Total anual</b>
<i>Ingresos</i>			
Etanol tratamiento	7 117,53 kg	1,80 USD/kg	\$4 676 219,55
Etanol Hidrólisis	2 080,78 kg	1,80 USD/kg	\$1 367 074,57
<b>Ventas totales</b>			<b>\$ 6 043 294,12</b>
<i>Costos variables</i>			
Ácido sulfúrico	3,94 ton	950,00 USD/ton	\$ 1 366 380,17
Enzimas (100 000FPU) <sup>B</sup>	19,70	\$ 498,53	\$ 3 584 679,97
Servicios (Electricidad) <sup>C</sup>	1314 kW	0,06 USD/kW	\$ 28 382,40
<b>Costos Variables Totales</b>			<b>\$ 4 979 442,54</b>
<i>Costos fijos</i>			
Salarios <sup>D</sup>	9	\$ 38,10	\$ 83 439,00
Mantenimiento equipos <sup>E</sup>			\$ 7 031,07
<b>Costos fijos totales</b>			<b>\$ 90 470,07</b>

<sup>A</sup> Los ingresos y costos están dados en la cantidad diaria que se requiere para el proceso, precio unitario y total anual.

<sup>B</sup> Las enzimas se venden en recipientes de 100 000FPU, por lo que diariamente se requieren 19,70 recipientes que tienen un valor de 498.53 USD por recipiente

<sup>C</sup> Se estima el consumo energético diario de los equipos requeridos para implementar el pretratamiento.

<sup>D</sup> Para los salarios se requieren 6 personas diariamente, las cuales tienen un costo de 38,10 USD por persona

<sup>E</sup> Para los costos de mantenimiento se considera un 5% de la inversión inicial.

En la Tabla 12 se observan ingresos anuales por producción de etanol de 6 043 294,12 USD, mientras que se reportan un total de costos variables de 4 979 442,54 USD/anuales, mientras que los costos fijos se mantienen igual los del tratamiento SAA, los cuales son de 90 470,07

USD por año. Dado el costo de inversión inicial y estimados los ingresos y costos relacionados al proceso ácido diluido se realizó el análisis de flujo de caja.

Para el caso del análisis financiero de la integración de ácido diluido al proceso se obtuvo una tasa interna de retorno de 27,46% con un valor actual neto de \$ 4 058 742,37, con un horizonte de evaluación de 10 años se tiene un retorno de inversión a partir del cuarto año, la rentabilidad del proyecto es muy similar a la del tratamiento SAA. Sin embargo, el proceso SAA presenta la ventaja que las aguas utilizadas durante el tratamiento tienen alta carga de nitrógeno, estas aguas se podrían tratar para realizar fertilizantes y así aumentar la productividad en la finca o bien generar nuevos ingresos.

## 5. CONCLUSIONES

Se determinó que la mezcla de 85% hoja y 15% tallo sin aplicar ningún tratamiento presenta un porcentaje de 71,81% de celulosa y hemicelulosa, misma que a su vez se puede transformar en carbohidratos estructurales como materia prima para la producción de etanol por medio de la fermentación. Por otra parte, la hoja sin tratamiento presenta un porcentaje de 70,62% de celulosa y hemicelulosa,

Adicionalmente, se estimó la cantidad de toneladas de rastrojo de piña que se produce por hectárea sembrada, se estima un promedio de 222 ton/ha, las cuales pueden producir 19,97 toneladas de celulosa y hemicelulosa, y estas transformarse en 17,97 ton de etanol.

Se determinó que el tratamiento con amoníaco acuoso que presenta mejores rendimientos es el que se da a una temperatura de 120 °C, un tiempo de 10 minutos, a una relación de 1:12 (kg/L) y utilizando la mezcla de tallo-hoja del rastrojo de piña; este tratamiento presentó un porcentaje de celulosa y hemicelulosa de 47,26% en la masa residual del tratamiento, lo que implica que el SAA extrajo alrededor de un 20% de los azúcares presentes en la masa inicial. Además, se realizó un tratamiento con ácido diluido para comparar con el SAA, el tratamiento de ácido diluido presentó un 33,55% de celulosa y hemicelulosa en la masa residual después del proceso, lo que indica que el tratamiento extrajo aproximadamente un 35% de los azúcares fermentables del rastrojo de piña.

Para integrar el proceso SAA al concepto de biorrefinería para la producción de etanol se estimó un TIR de 24,34% lo que indica que el proyecto es rentable, para esto se consideró la venta del etanol al mismo precio que la gasolina en Costa Rica.

Para comprar el proceso SAA se realizó el estudio financiero para integrar el tratamiento con ácido diluido para el cual se estimó un TIR de 27,46%, por lo que ambos procesos son similares en términos financieros.

## **6. RECOMENDACIONES**

- Realizar nuevos ensayos utilizando amoníaco acuoso y ajustando la relación biomasa-hidróxido de amonio, esto con el fin de medir el rendimiento de la obtención de azúcares fermentables y optimizar el proceso, ya que las relaciones empleadas no presentaron diferencias significativas, por lo que se puede evaluar el impacto de nuevas relaciones
- Repetir el experimento reduciendo el número de variables independientes de modo que se obtengan resultados más concisos y precisos. Esto permitirá evaluar más a detalle cada una de las variables y su influencia sobre los resultados.
- Realizar pruebas de HPLC que permitan identificar los tipos de azúcares fermentables en la fracción líquida con el fin de obtener datos más exactos en el potencial proceso de fermentación.
- Explorar la producción del hidróxido de amonio en la planta o sus alrededores con el fin de optimizar el uso de los recursos disponibles y mejorar la rentabilidad del proceso.
- Realizar un análisis económico más detallado, donde se contemple la venta o implementación en la finca de las aguas residuales del proceso SAA, ya que estas se encuentran cargadas de nitrógeno y se pueden usar como fertilizante, así como la disminución de costos por el manejo del rastrojo en campo.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Aden, A., Ruth, M., Ibsen, K., Jechura, J., Neeves, K., Sheehan, J., y Wallace, B. (2002).

Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover. Laboratorio de Energías Renovables de Estados Unidos

Akus-Szylberg, F., Antczak, A., y Zawadzki, J. (2021). Efectos del pretratamiento con amoníaco acuoso de remojo sobre propiedades seleccionadas e hidrólisis enzimática de la madera de álamo. Vol. 16. No. 3. <https://n9.cl/d6fjo>

Ankita, J., Deepak, K., Karthik, R., y Ashutosh, M. (2023). Tecnologías de pretratamiento para refinerías de biomasa lignocelulósica. *Reseña de Biotecnología Aplicada*. pp. 81-106 <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91192-4.00004-3>

Arellano, C. (2015). Obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos sometidos a hidrólisis enzimática. [Tesis de maestría, Universidad de Veracruz]. <https://n9.cl/ozf4o>

Arguedas, C., Vargas, C., y Miller G. (2021). Informe: Monitoreo del estado de la piña en Costa Rica para el año 2019, asociado con la pérdida y ganancia entre la cobertura forestal. <https://n9.cl/ana3k>

Castillo, M., Severiche, J., y Acevedo, R. (2013). Manual de Métodos Analíticos para la Determinación de Parámetros Fisicoquímicos Básicos en Aguas. <https://n9.cl/uts70>

Chundawat, S., Donohoe, B. S., da Costa Sousa, L., Elder, T., Agarwal, U. P., Lu, F., Ralph, J., Himmel, M. E., Balan, V., & Dale, B. E. (2011). Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment. *Energy and Environmental Science*, 4(3), 973–984. <https://doi.org/10.1039/c0ee00574f>

- Córdoba, M. y Molina, M. (2014). Determinación del efecto de la concentración de la Celulasa, Celobiasa y de NaOH en la hidrólisis para la producción de etanol a partir del rastrojo de piña. Vol. 24, No. 2.  
[https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/ingenieria/article/view/11767/pdf\\_30](https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/ingenieria/article/view/11767/pdf_30)
- Cortes, W. (2014). Tratamientos aplicables a materiales lignocelulósicos para la obtención de etanol y productos químicos. Universidad el Bosque. Vol. 13. No. 1. pp. 39-44.
- Decheco, A. (2016). Aprovechamiento de residuos de *Ananas comosus* (Piña) para la producción de etanol por vía fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae*.  
<https://n9.cl/612xu>
- Espinoza, A., Mailín, L., y Casdelo, N. (2021). Pretratamiento de biomasa lignocelulósica: breve revisión de los principales métodos utilizados. Vol. 48, No. 3  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2223-48612021000300108](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612021000300108)
- Fang C, Smith P, Moncrieff JB, Smith JU (2005) Similar response of labile and resistant soil organic matter pools to changes in temperature. Nature 433:57–59
- Fernández, G. (2024). Extracción: Separación mediante extracción.  
<https://www.quimicaorganica.net/extraccion.html>
- Forero, A. (2018). Revisión de los pretratamientos ácido diluido, alcalino y afex aplicados a diferentes tipos de biomásas [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia].  
<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/69398/1075653148.2018.pdf?sequence=1>
- Gómez, E., Rios, L., y Peña, J. (2013). Efecto del Pretratamiento de Biomasa Maderera en el Rendimiento a Etanol. Información tecnológica. Vol.24, No. 5. pp 113-122.

- Hernández, R. y Prado, L. (2018). Impacto y oportunidad de biorrefinería de los desechos agrícolas del cultivo de piña (*Ananas comosus*) en Costa Rica. Vol.10, No. 2. <https://n9.cl/6vln0>
- Himmelsbach, J. (2009). Remojo en amoníaco acuoso (AAS) como método de pretratamiento de biomasa: estudio a escala piloto con pasto varilla, uso a escala de banco con álamo y potencial de metano de la digestión anaeróbica de pasto varilla pretratado. [Tesis de maestría, Universidad de Iowa].
- Jaikel, J. y Ulate, A. (2021). Evaluación del efecto del pretratamiento del rastrojo de piña para la producción de hidrógeno vía reformado en fase acuosa (APR). Vol. 31. No. 2. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/ingenieria/article/view/43545/45807>
- Llenque, L., Quintana, A., Torres, L., y Segura, S. (2020). Producción de bioetanol a partir de residuos orgánicos vegetales. Revista de investigación científica (REBIOL). Vol. 40. No. 1.
- Liao, C., Guana, YJ., y Bustamante, M. (2022). Análisis tecnoeconómico y evaluación del ciclo de vida del aprovechamiento de las hojas de piña en Costa Rica. Energías 15(16, 5784). <https://n9.cl/p5woi>
- Maglianesi, M. (2013). Desarrollo de las piñeras en Costa Rica y sus impactos sobre ecosistemas naturales y agro-urbanos. Vol. 27. No. (1-2). <https://revistas.uned.ac.cr/index.php/biocenosis/article/view/611/507>
- Morales, J. (2020). Producción de etanol a partir de residuos de piña. [Tesis de maestría, Tecnológico Nacional de México]

- Moya, R. (2022). ¿Los rastrojos de la piña un contaminante o una mejor alternativa?. El mundo.cr <https://elmundo.cr/opinion/los-rastrojos-de-la-pina-un-contaminante-o-una-mejor-alternativa/>
- Murillo, M. (2018). Potencial biotecnológico de *Umbelopsis isabellina* para producir lípidos de importancia industrial de los residuos de la planta de piña. [Tesis de maestría, Universidad de Costa Rica]
- Novia, N., Muhammad, S., Asyeni, M., Pebriantoni, P., y Muham, B. (2020). Pretratamiento de ácido diluido con remojo de amoníaco acuoso para producir bioetanol a partir de cascara de arroz. Vol. 62. No. 03. pp 891-900. <https://n9.cl/ovri1>
- Pérez, C. (2017). Cálculos para la esterilización por inyección directa de vapor del medio de cultivo empleado en la producción de HeberNem. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Camagüey. Cuba. <http://scielo.sld.cu/pdf/rtq/v37n3/rtq10317.pdf>
- Petrus, M. (2018). Proceso para hidrólisis enzimática de material lignocelulósico y fermentación de azúcares. IFI CLAIMS Patent Services. <https://patents.google.com/patent/MX2015005631A/es>
- Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica (2022). Exportación de piña fresca a mercados europeos. PROCOMER. <https://n9.cl/ek08k>
- Rajesh, G. (2010). Investigación del mecanismo de degradación de la biomasa en el pretratamiento de pasto varilla con amoníaco acuoso e hidróxido de sodio. Tecnología Bioambiental. Vol. 21, No. 101. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.039>
- Ramírez, R., Rojas, O., Alvarado, P., y Vega, J. (2012). Obtención de xilosa a partir de desechos lignocelulósicos de la producción y proceso industrial de la piña (*Ananas comusus*). UNICIENCIA 26. pp. 75-89

- RECOPE. (2023). Análisis del Proyecto Gasolina con Etanol (Primer informe de avance) <https://www.recope.go.cr/wp-content/uploads/2023/09/Informe-Etanol-I-avance-2023.pdf>
- Ricer, E.W., Baird, R.B., y Eaton, A.D. (2017). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23<sup>rd</sup> Edición. <https://yabesh.ir/wp-content/uploads/2018/02/Standard-Methods-23rd-Perv.pdf>
- Santos, J., y Zabala, D. (2016). Evaluación de la producción de etanol a partir de residuos orgánicos y diferentes mezclas, generados en la empresa de alimentos Sas S.A.S [Proyecto de licenciatura, Fundacion Universidad de America]. <https://n9.cl/81v51>
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., y Templeton, D. (2005). Determination of Extractives in Biomass. Laboratorio de Energías Renovables de Estados Unidos
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. y Crocker, D. (2012). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Laboratorio de Energías Renovables de Estados Unidos
- Suárez, C., Garrido, N., y Guerra, C. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. Vol. 50, No. 1. pp. 20-28
- Vale, A., Abril, M., Zalamea, T., y Pinos V. (2021). Mini revisión: aplicación de líquidos iónicos en hidrólisis ácida de material lignocelulósico para la obtención de azúcares. Ciencia en Desarrollo. Vol.12, No. 1. <https://doi.org/10.19053/01217488.v12.n1.2021.12477>
- Vargas, A., Morales, M., Watler, W., y Vignola, R. (2018). Cultivo de Piña en Costa Rica. Ministerio de Agricultura y Ganadería. <https://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-8166.pdf>

## 6. ANEXOS

### Anexo A. Resumen de metodología APHA, (2017) sección 2540 (Ricer, et al., 2017)

Se determinó la cantidad de sólidos totales (ST) y ceniza (SF) que tiene la muestra con las siguientes ecuaciones:

$$ST \text{ o } SF [\%] = \left( \frac{A - B}{C - B} \right) \cdot 100 \quad (10)$$

$$ST \text{ o } SF \left[ \frac{mg}{kg} \right] = \left( \frac{(A - B) \times 10^3}{C - B} \right) \times 10^3 \quad (11)$$

además, se determinó el porcentaje de humedad

$$Humedad (\%) = 100 - ST[\%] \quad (12)$$

Y se determinó la cantidad de sólidos volátiles (SV) a partir de la siguiente ecuación

$$SV = ST - SF \quad (13)$$

Donde,  $A$  es la masa residual de la muestra luego del secado (a 105 o 550 °C) más la masa del crisol (mg),  $B$  es la masa del crisol (mg), y  $C$  es la masa de la muestra antes del secado (a 105 o 550 °C) + la masa del crisol (mg).

## Anexo B. Flujo de caja para el análisis financiero de la implementación de SAA al concepto de biorrefinería <sup>A</sup>

Ingresos	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7	Año 8	Año 9	Año 10
Etanol tratamiento (kg)		1 667 104,79	1 667 104,79	1 667 104,79	1 667 104,79	1 667 104,79	1 667 104,79	1 667 104,79	1 667 104,79	1 667 104,79	1 667 104,79
Etanol Hidrólisis (kg)		1 283 701,03	1 283 701,03	1 283 701,03	1 283 701,03	1 283 701,03	1 283 701,03	1 283 701,03	1 283 701,03	1 283 701,03	1 283 701,03
Precio etanol (USD/kg)		\$ 1,80	\$ 1,84	\$ 1,87	\$ 1,91	\$ 1,95	\$ 1,99	\$ 2,03	\$ 2,07	\$ 2,11	\$ 2,15
<b>Ventas totales</b>		<b>\$ 5 311 450,48</b>	<b>\$ 5 417 679,49</b>	<b>\$ 5 526 033,08</b>	<b>\$ 5 636 553,74</b>	<b>\$ 5 749 284,81</b>	<b>\$ 5 864 270,51</b>	<b>\$ 5 981 555,92</b>	<b>\$ 6 101 187,04</b>	<b>\$ 6 223 210,78</b>	<b>\$ 6 347 674,99</b>

Costos variables	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7	Año 8	Año 9	Año 10
Amonio (ton)		16,52	16,52	16,52	16,52	16,52	16,52	16,52	16,52	16,52	16,52
Precio amoniaco (USD ton)		\$ 1 500,00	\$ 1 530,00	\$ 1 560,60	\$ 1 591,81	\$ 1 623,65	\$ 1 656,12	\$ 1 689,24	\$ 1 723,03	\$ 1 757,49	\$ 1 792,64
Enzimas (100 000FPU/g celulosa)		8 285,71	8 285,71	8 285,71	8 285,71	8 285,71	8 285,71	8 285,71	8 285,71	8 285,71	8 285,71
Precio enzimas (100 000FPU)		\$ 498,53	\$ 499,55	\$ 499,55	\$ 499,55	\$ 499,55	\$ 499,55	\$ 499,55	\$ 499,55	\$ 499,55	\$ 499,55
Servicios (Electricidad)		\$ 28 382,40	\$ 28 382,40	\$ 28 382,40	\$ 28 382,40	\$ 28 382,40	\$ 28 382,40	\$ 28 382,40	\$ 28 382,40	\$ 28 382,40	\$ 28 382,40
<b>Costos Variables Totales</b>		<b>\$ 4 183 841,56</b>	<b>\$ 4 192 788,70</b>	<b>\$ 4 193 294,33</b>	<b>\$ 4 193 810,07</b>	<b>\$ 4 194 336,13</b>	<b>\$ 4 194 872,71</b>	<b>\$ 4 195 420,02</b>	<b>\$ 4 195 978,28</b>	<b>\$ 4 196 547,70</b>	<b>\$ 4 197 128,51</b>

22,70

Costos fijos	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7	Año 8	Año 9	Año 10
Salarios		\$ 83 439,00	\$ 83 439,00	\$ 83 439,00	\$ 83 439,00	\$ 83 439,00	\$ 83 439,00	\$ 83 439,00	\$ 83 439,00	\$ 83 439,00	\$ 83 439,00
Mantenimiento equipos		\$ 7 031,07	\$ 7 031,07	\$ 7 031,07	\$ 7 031,07	\$ 7 031,07	\$ 7 031,07	\$ 7 031,07	\$ 7 031,07	\$ 7 031,07	\$ 7 031,07
<b>Costos fijos totales</b>		<b>\$ 90 470,07</b>									

Inversiones	Vida útil	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7	Año 8	Año 9	Año 10
Tanque acero inoxidable	15	\$ 47 460,00										
Bomba centrífuga	10	\$ 423,11					\$ 423,11					\$ 423,11
Bomba dosificadora	15	\$ 2 559,60					\$ 2 559,60					
Banda transportadora	10	\$ 8 350,67										\$ 8 350,67
Prensa de tornillo	20	\$ 34 368,00										
Tanque de hidrólisis	15	\$ 47 460,00										
<b>Total de inversión</b>		<b>\$ 140 621,38</b>					<b>\$ 2 982,71</b>					<b>\$ 2 982,71</b>

Depreciación	Valor del activo	Vida útil	Depreciación	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7	Año 8	Año 9	Año 10
Tanque acero inoxidable	\$ 47 460,00	15	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00
Bomba centrífuga	\$ 423,11	5	\$ 84,62	\$ 84,62	\$ 84,62	\$ 84,62	\$ 84,62	\$ 84,62	\$ 84,62				
Bomba dosificadora	\$ 2 559,60	5	\$ 511,92	\$ 511,92	\$ 511,92	\$ 511,92	\$ 511,92	\$ 511,92	\$ 511,92				
Banda transportadora	\$ 8 350,67	10	\$ 835,07	\$ 835,07	\$ 835,07	\$ 835,07	\$ 835,07	\$ 835,07	\$ 835,07	\$ 835,07	\$ 835,07	\$ 835,07	\$ 835,07
Prensa de tornillo	\$ 34 368,00	20	\$ 1 718,40	\$ 1 718,40	\$ 1 718,40	\$ 1 718,40	\$ 1 718,40	\$ 1 718,40	\$ 1 718,40	\$ 1 718,40	\$ 1 718,40	\$ 1 718,40	\$ 1 718,40
Tanque de hidrólisis	\$ 47 460,00	15	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00
<b>Total de inversión</b>	<b>\$ 143 604,08</b>			<b>\$ 11 196,41</b>									

Capital de trabajo	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7	Año 8	Año 9	Año 10
Costos variables		\$ 4 183 841,56	\$ 4 192 788,70	\$ 4 193 294,33	\$ 4 193 810,07	\$ 4 194 336,13	\$ 4 194 872,71	\$ 4 195 420,02	\$ 4 195 978,28	\$ 4 196 547,70	\$ 4 197 128,51
Capital de trabajo		\$ 1 062 290,10	\$ 1 083 535,90	\$ 1 105 206,62	\$ 1 127 310,75	\$ 1 149 856,96	\$ 1 172 854,10	\$ 1 196 311,18	\$ 1 220 237,41	\$ 1 244 642,16	\$ 1 269 535,00
Inversión en capital de trabajo	-1 062 290,10	-\$ 1 083 535,90	-\$ 1 105 206,62	-\$ 1 127 310,75	-\$ 1 149 856,96	-\$ 1 172 854,10	-\$ 1 196 311,18	-\$ 1 220 237,41	-\$ 1 244 642,16	-\$ 1 269 535,00	
Recuperación de capital de trabajo											\$ 11 631 780,17

<sup>A</sup>: En el precio del etanol se considera un incremento anual del 2%

## Anexo C. Flujo de caja para el análisis financiero de la implementación del tratamiento con ácido diluido al concepto de biorrefinería <sup>A</sup>

Ingresos	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7	Año 8	Año 9	Año 10
Etanol tratamiento (kg)		2 597 899,75	2 597 899,75	2 597 899,75	2 597 899,75	2 597 899,75	2 597 899,75	2 597 899,75	2 597 899,75	2 597 899,75	2 597 899,75
Etanol Hidrólisis (kg)		759 485,87	759 485,87	759 485,87	759 485,87	759 485,87	759 485,87	759 485,87	759 485,87	759 485,87	759 485,87
Precio etanol		\$ 1,80	\$ 1,84	\$ 1,87	\$ 1,91	\$ 1,95	\$ 1,99	\$ 2,03	\$ 2,07	\$ 2,11	\$ 2,15
<b>Ventas totales</b>		<b>\$ 6 043 294,12</b>	<b>\$ 6 164 160,00</b>	<b>\$ 6 287 443,20</b>	<b>\$ 6 413 192,07</b>	<b>\$ 6 541 455,91</b>	<b>\$ 6 672 285,03</b>	<b>\$ 6 805 730,73</b>	<b>\$ 6 941 845,34</b>	<b>\$ 7 080 682,25</b>	<b>\$ 7 222 295,89</b>

Costos variables	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7	Año 8	Año 9	Año 10
Ácido sulfúrico (ton)		1 438,29	1 438,29	1 438,29	1 438,29	1 438,29	1 438,29	1 438,29	1 438,29	1 438,29	1 438,29
Precio ácido sulfúrico		\$ 950,00	\$ 950,00	\$ 950,00	\$ 950,00	\$ 950,00	\$ 950,00	\$ 950,00	\$ 950,00	\$ 950,00	\$ 950,00
Enzimas (100 000FPU/g celulosa)		7 189,80	7 189,80	7 189,80	7 189,80	7 189,80	7 189,80	7 189,80	7 189,80	7 189,80	7 189,80
Precio enzimas (100 000FPU)		\$ 498,53	\$ 498,53	\$ 498,53	\$ 498,53	\$ 498,53	\$ 498,53	\$ 498,53	\$ 498,53	\$ 498,53	\$ 498,53
Servicios (Electricidad)		\$ 28 382,40	\$ 28 382,40	\$ 28 382,40	\$ 28 382,40	\$ 28 382,40	\$ 28 382,40	\$ 28 382,40	\$ 28 382,40	\$ 28 382,40	\$ 28 382,40
<b>Costos Variables Totales</b>		<b>\$ 4 979 093,35</b>									

Costos fijos	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7	Año 8	Año 9	Año 10
Salarios		\$ 83 439,00	\$ 85 107,78	\$ 86 809,94	\$ 88 546,13	\$ 90 317,06	\$ 92 123,40	\$ 93 965,87	\$ 95 845,18	\$ 97 762,09	\$ 99 717,33
Mantenimiento equipos		\$ 7 031,07	\$ 7 031,07	\$ 7 031,07	\$ 7 031,07	\$ 7 031,07	\$ 7 031,07	\$ 7 031,07	\$ 7 031,07	\$ 7 031,07	\$ 7 031,07
<b>Costos fijos totales</b>		<b>\$ 90 470,07</b>	<b>\$ 92 138,85</b>	<b>\$ 93 841,00</b>	<b>\$ 95 577,20</b>	<b>\$ 97 348,13</b>	<b>\$ 99 154,47</b>	<b>\$ 100 996,93</b>	<b>\$ 102 876,25</b>	<b>\$ 104 793,16</b>	<b>\$ 106 748,40</b>

Inversiones	Vida útil	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7	Año 8	Año 9	Año 10
Tanque acero inoxidable	15	\$ 47 460,00										
Bomba centrífuga	10	\$ 423,11					\$ 507,73					\$ 609,28
Bomba dosificadora	15	\$ 2 559,60					\$ 3 071,52					
Banda transportadora	10	\$ 8 350,67										\$ 3 685,82
Prensa de tornillo	20	\$ 34 368,00										
Tanque de hidrólisis	15	\$ 47 460,00										
<b>Total de inversión</b>		<b>\$ 140 621,38</b>										<b>\$ 4 295,10</b>

Depreciación	Valor del activo	Vida útil	Depreciación	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7	Año 8	Año 9	Año 10
Tanque acero inoxidable	\$ 47 460,00	15	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00
Bomba centrífuga	\$ 423,11	5	\$ 84,62	\$ 84,62	\$ 84,62	\$ 84,62	\$ 84,62	\$ 84,62	\$ 84,62				
Bomba dosificadora	\$ 2 559,60	5	\$ 511,92	\$ 511,92	\$ 511,92	\$ 511,92	\$ 511,92	\$ 511,92	\$ 101,55	\$ 101,55	\$ 101,55	\$ 101,55	\$ 101,55
Bomba dosificadora	\$ 3 071,52	5	\$ 614,30						\$ 614,30	\$ 614,30	\$ 614,30	\$ 614,30	\$ 614,30
Banda transportadora	\$ 8 350,67	10	\$ 835,07	\$ 835,07	\$ 835,07	\$ 835,07	\$ 835,07	\$ 835,07	\$ 835,07	\$ 835,07	\$ 835,07	\$ 835,07	\$ 835,07
Prensa de tornillo	\$ 34 368,00	10	\$ 3 436,80	\$ 3 436,80	\$ 3 436,80	\$ 3 436,80	\$ 3 436,80	\$ 3 436,80	\$ 3 436,80	\$ 3 436,80	\$ 3 436,80	\$ 3 436,80	\$ 3 436,80
Tanque de hidrólisis	\$ 47 460,00	15	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00	\$ 3 164,00
<b>Total de inversión</b>	<b>\$ 144 200,63</b>			<b>\$ 11 196,41</b>	<b>\$ 11 315,72</b>								

Capital de trabajo	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6	Año 7	Año 8	Año 9	Año 10
Costos variables		\$ 4 979 093,35	\$ 4 979 093,35	\$ 4 979 093,35	\$ 4 979 093,35	\$ 4 979 093,35	\$ 4 979 093,35	\$ 4 979 093,35	\$ 4 979 093,35	\$ 4 979 093,35	\$ 4 979 093,35
Capital de trabajo		\$ 995 818,67	\$ 995 818,67	\$ 995 818,67	\$ 995 818,67	\$ 995 818,67	\$ 995 818,67	\$ 995 818,67	\$ 995 818,67	\$ 995 818,67	\$ 995 818,67
Inversión en capital de trabajo	-995 818,67	-\$ 995 818,67	-\$ 995 818,67	-\$ 995 818,67	-\$ 995 818,67	-\$ 995 818,67	-\$ 995 818,67	-\$ 995 818,67	-\$ 995 818,67	-\$ 995 818,67	-\$ 995 818,67
Recuperación de capital de trabajo											<b>\$ 9 958 186,71</b>

<sup>A</sup>: En el precio del etanol se considera un incremento anual del 2%

