

ARTICULO DE REVISIÓN

PRETRATAMIENTOS BIOLÓGICOS DE RESIDUOS DE COSECHA ORIENTADO A LA OBTENCIÓN DE BIOFERTILIZANTES Y BIOENERGÍA

BIOLOGICAL PRE-TREATMENT OF CROP WASTE ORIENTED TO OBTAIN BIOFERTILIZERS AND BIOENERGY

Alianny L. Rojo Sánchez^{a,*} (<https://orcid.org/0000-0003-2259-9803>)
Annerys Carabeo Pérez^b (<https://orcid.org/0000-0003-0129-5544>)
Raylen Escobar Román^b (<https://orcid.org/0000-0002-2615-5495>)
Lisbet M. López González^b (<https://orcid.org/0000-0002-2362-5703>)
Janet Jiménez Hernández^b (<https://orcid.org/0000-0003-1631-6539>)

^a Centro de Estudio de Energía y Procesos Industriales (CEEPI), Universidad de Sancti Spíritus “José Martí Pérez” (UNISS). Ave.de los Mártires No. 360, CP 60100, Sancti Spíritus (CUBA).

^b Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Veterinaria, Universidad de Sancti Spíritus “José Martí Pérez” (UNISS). Ave.de los Mártires No. 360, CP 60100, Sancti Spíritus (CUBA).

*aroja@uniss.edu.cu

Recibido: 11 de febrero de 2022;

Aceptado: 07 de noviembre de 2022;

RESUMEN

En la naturaleza, la principal fuente de material renovable es la biomasa lignocelulósica proveniente de diferentes residuos agroindustriales y se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina. La presencia de lignina en estos tejidos, genera una barrera que impide la exposición adecuada de la celulosa para el proceso de hidrólisis enzimática. Por tanto, es necesario utilizar diferentes pretratamientos lo suficientemente fuertes para que permitan la degradación de la lignina, la disminución de la cristalinidad de la celulosa y el incremento del área superficial para poder complementar el posterior hidrólisis enzimática. En esta revisión se abordará la definición de biomasa y la composición general de los materiales lignocelulósicos. También se especificarán los diferentes tipos de pretratamientos; principalmente el biológico, ya que a través de ellos se puede lograr el fraccionamiento del material y a partir de sus componentes obtener biocombustibles y bioenergía.

Palabras Claves: residuos agroindustriales, materiales lignocelulósicos, pretratamiento, biocombustibles, bioenergía.

ABSTRACT

In nature, the main source of renewable material is lignocellulosic biomass from different agro-industrial wastes and is mainly composed of cellulose, hemicellulose and lignin. The presence of lignin in these tissues generates a barrier that prevents the adequate exposure of cellulose for the enzymatic hydrolysis process, which is why it is necessary to characterize different strong enough pretreatments to allow the degradation of lignin, the decrease of the crystallinity of cellulose and the increase of the surface area to be able to complement the subsequent enzymatic hydrolysis. Therefore, this review will address the definition of biomass, the general composition of lignocellulosic materials, and specify the different types of pretreatments that can be carried out to achieve the fractionation of the material and obtain biofuels and chemical products from its component of commercial importance.

Key words: Crop waste, lignocellulosic materials, pretreatment, biofuels, bioenergy.

INTRODUCCION

Con el agotamiento de los combustibles fósiles y la necesidad de reducir las emisiones producidas por estos, se hace más evidente la importancia de hacer una transición hacia un esquema energético más sostenible (Rodríguez., 2016), basado en el aprovechamiento de las fuentes renovables de energía (Gallardo, Ortiz, Gómez, Moreno, & González, 2017). De estas, la bioenergía (energía proveniente de la biomasa) constituye el recurso más abundante a nivel global. El uso tradicional se refiere a la combustión de biomasa en formas tales como madera, desechos animales y carbón vegetal tradicional. Las tecnologías modernas de bioenergía incluyen biocombustibles líquidos producidos a partir de bagazo y otras plantas; biorrefinerías; biogás producido por digestión anaeróbica de residuos; sistemas de calefacción de pellets de madera; y otras tecnologías.

El biogás constituye un recurso energético que puede utilizarse para cualquiera de las grandes aplicaciones energéticas dada a la alta concentración de metano: eléctrica, térmica o como carburante. Además. La tecnología permite otras bondades como la obtención de biofertilizantes y compuestos de valor agregado a la vez que se logra una adecuada biodegradación de residuos. Es una alternativa que permite obtener energía para cubrir las necesidades de combustible en los hogares principalmente de las zonas rurales y también fortalecer a empresas pequeñas y medianas (Aguilera, 2016).

La producción de biogás en Cuba utiliza fundamentalmente excretas porcinas y vacunas como sustratos, sin embargo, otros residuos como la biomasa lignocelulósica no son aprovechados a pesar de su alto potencial (Suárez et al., 2018). Actualmente, la mayor dificultad con el sustrato lignocelulósico es la adecuada degradación de la biomasa debido a la compleja y recalcitrante naturaleza de la materia prima (Abraham et al., 2020).

La biomasa de tipo lignocelulósico proviene principalmente de residuos agrícolas, por lo que está compuesta de tres polímeros fundamentales tales como celulosa, hemicelulosa y lignina (Rodríguez., 2016). Lograr el fraccionamiento de esta biomasa y obtener los polímeros de celulosa y hemicelulosa, es un trabajo muy complejo, debido a que el elevado contenido de lignina presente impide la separación de los polisacáridos para su posterior hidrólisis (Buffone et al., 2018). Para esto es necesario emplear pretratamientos físicos, químicos, biológicos o la combinación de estos, para que permitan la separación de los polímeros, pero sin generar reacciones secundarias de estos azúcares en productos indeseados (Ziemiński & Kowalska-Wentel, 2016).

Son limitadas las experiencias en Cuba acerca del pretratamiento biológico de biomassas residuales agrícolas orientado a la obtención de compuestos con valor agregado (nutrientes y bioenergías) y no se constatan experiencias con el enfoque de biorrefinería que permitan no solo diversificar producciones sino cerrar ciclos productivos bajo el concepto de economía circular.

El objetivo del presente trabajo es presentar una revisión de los métodos de pre-tratamientos de la biomasa lignocelulósica, enfatizando principalmente en los principales métodos de pretratamientos biológicos orientados a su uso como fuente de bioenergía, que permitan no solo diversificar producciones sino cerrar ciclos productivos.

Bioenergía

A partir del conocimiento sobre las necesidades de utilizar la bioenergía para el mejoramiento de las condiciones ambientales ocasionadas por el uso de combustibles fósiles y las emisiones del efecto del gas invernadero causante del cambio climático, es importante evaluar las diferentes rutas de conversión de la biomasa con el fin de disminuir estos impactos sobre el Medio Ambiente.

La biomasa es básicamente una fuente de energía solar almacenada por las plantas mediante el proceso de fotosíntesis. Durante este se captura dióxido de carbono y vapor de agua que con ayuda de la luz solar se convierte en glucosa, la cual da origen a almidones, celulosa, hemicelulosa, y lignina, entre otros compuestos. El término biomasa, por lo tanto, se refiere en este contexto a toda aquella materia orgánica que puede ser degradada anaeróbicamente (Weinrich, Schafer, & Liebetrau, 2018). Las fuentes de biomasa más utilizados son los residuos agrícolas, los de procesos forestales, procesamiento de la madera, desechos de animales, residuos sólidos urbanos (RSU), desechos de procesamiento de alimentos, los cultivos sembrados exclusivamente para su aprovechamiento energético (Hernández-Beltrán et al., 2019). (Figura 1)

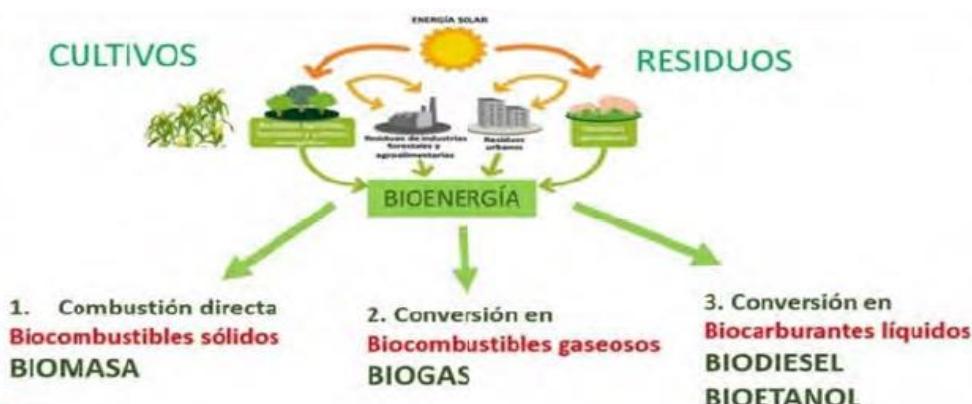


Fig.1. Obtención de las diferentes fuentes de bioenergías (González, Curbelo, Melo, & Reyes, 2014)

Los residuos de cosecha constituyen una fuente de nutrientes, ya que permiten devolver al suelo todo lo extraído y por otro lado forman una fuente de bioenergía, pues permite aprovechar y almacenar la energía proveniente del sol mediante el proceso de fotosíntesis. La biomasa, en teoría, puede producirse a partir de la fracción orgánica de cualquier material, pero en la actualidad, se prefieren aquellas materias primas que son fácilmente degradable. Sin embargo, estas no son tan abundantes por lo que el desarrollo de otras tecnologías innovadoras que permitan el uso de esas materias primas que no son fácilmente degradables daría como resultado un aumento en la producción de biogás (Patinvoh, Osadolor, Chandolias, Horváth, & Taherzadeh, 2017).

Composición química de los materiales lignocelulósicos

Dentro de la biomasa lignocelulósica se encuentran los residuos de los procesos industriales, agrícolas y forestales. Se compone principalmente por tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, cuya interacción es compleja, y varía según el residuo lignocelulósico del que se trate (Morales, 2015).

Celulosa: se encuentra en forma de fibras alargadas, rodeada por la hemicelulosa que presenta una especie de red entorno a ella (Ayeni, Adeeyo, Oresegun, & Oladimeji, 2015). Esta estructura surge como respuesta a una necesidad de los vegetales, ya que la pared celular admite crear y sostener la estructura aérea de las plantas que les permite captar la radiación solar. Así, tejidos con células lignificadas dotan a sus órganos, principalmente tallos, de mayor esbeltez y mayor resistencia mecánica, además de mejorar su regulación hídrica y resistencia a patógenos (Bau, 2016).

Este polímero es el principal componente de la pared celular en las plantas es de alto peso molecular, lineal y polidisperso. Tiene una estructura fibrosa, blanca, muy estable y resistente al ataque químico, también a la tracción mecánica (Haslinger, Hietala, Hummel, Maun, & Sixta, 2019). Físicamente es una fibra vegetal que al ser observada en el microscopio es similar a un cabello humano; su longitud y espesor varía según el tipo de árbol o planta. Es una fuente de glucosa prácticamente inagotable que se renueva de forma continua mediante la fotosíntesis (Kucharska et al., 2018).

La celulosa es un polímero de cadena lineal, formado por la unión de unidades anhidroglucosa (β -D-glucosa), en cadenas de glucano. Las unidades anhidroglucosa, están unidas por enlaces β -(1,4)-glucosídicos. Debido al carácter asimétrico de este enlace, también puede considerarse a la celulosa como un poliacetal del dímero celobiosa (4-O- β -D-glucopiranósil- β -D-glucopiranósil) (Figura 1), que también puede obtenerse por hidrólisis parcial de la celulosa (Jaramillo, Morales, & Diaz, 2017). La naturaleza cristalina de la celulosa incrementa su resistencia a la degradación biológica (Karimi & Taherzadeh, 2016), y por tanto dificulta la fase de hidrólisis durante el proceso de digestión anaerobia.

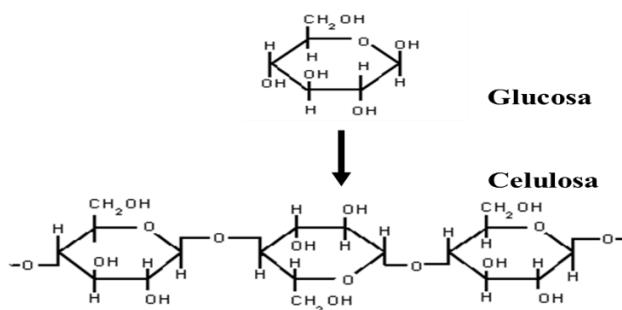


Fig.1. Estructura primaria de la celulosa (Bau, 2016).

Hemicelulosa: es un polímero complejo de heteropolisacárido constituido por unidades diferentes de monosacáridos (pentosas y hexosas), que forman cadenas más cortas y con ramificaciones, pero de bajo peso molecular en comparación con la celulosa. Estas moléculas se asocian a la celulosa mediante interacciones polisacárido-polisacárido (Haslinger et al., 2019). Son los segundos polisacáridos más abundantes en la pared celular vegetal, son insolubles en agua, pero en medio alcalino se disuelven.

Los monómeros que constituyen las hemicelulosas son principalmente monosacáridos u osas y derivados de las osas como los ácidos urónicos. Los monosacáridos principales que se encuentran en las hemicelulosas son cinco; tres hexosas: glucosa, manosa y galactosa, y dos pentosas: xilosa y arabinosa (Szymanska, Chylniska, Gdula, Koziol, & Zdunek, 2017) (Figura 2). La estructura amorfía y el bajo grado de polymerización de la hemicelulosa posibilitan su degradación física, química y biológica, con resultados superiores a la celulosa.

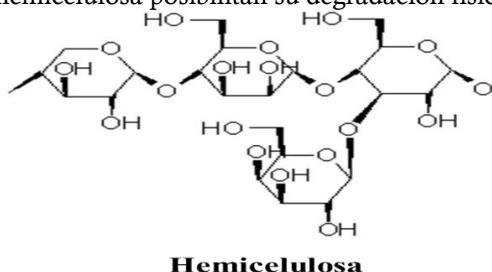


Fig.2. Estructura de la hemicelulosa (Bau, 2016).

Lignina: El tercer componente más importante de los materiales lignocelulósicos es la lignina. Este es un heteropolímero amorfía, de alto peso molecular, tridimensional y ramificado formado por alcoholes aromáticos que da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa), y es altamente resistente a la degradación química y biológica (Kucharska et al., 2018). Se encuentra principalmente en la lámina media y en las capas de la pared celular. Con las hemicelulosas forman un matriz alrededor de las microfibrillas de celulosa (Fernandez, 2017).

La lignina se obtiene por la condensación de precursores fenólicos unidos por diferentes enlaces, que se alternan de manera desordenada. Los monómeros que la conforman son los denominados alcoholes cinamílicos, diferenciados entre sí por las diferentes sustituciones que presenta el anillo aromático (Galiwango, Rahman, Marzouqi, Omar, & Khaleel, 2018). Así, el alcohol p-cumarílico que da lugar a las unidades p-hidroxifenilo (unidades H) no presenta ningún sustituyente; el alcohol coniferílico que da lugar a las unidades guayacilo (unidades G) presenta un grupo metoxilo en la posición 3 del anillo aromático y el alcohol sinapílico que da lugar a las unidades siringilo (unidades S) presenta dos grupos metoxilo en posiciones 3 y 5 de dicho anillo (Figura 3) (Espinosa, López, & Casdello, 2021).

Tanto la celulosa como la hemicelulosa pueden ser digeridas en un proceso de digestión anaerobia, sin embargo, la lignina es considerada un compuesto recalcitrante. De ahí que para residuos con alto porcentaje de lignina es recomendable que sean utilizados procesos termoquímicos para la obtención de energía.

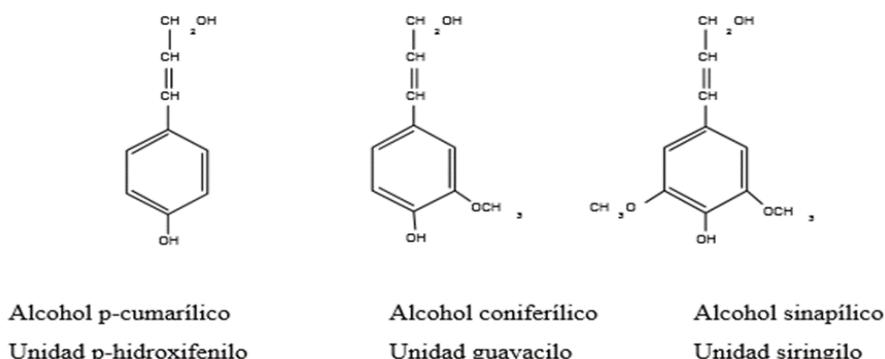


Fig.3. Alcoholes cinamílicos precursores de la lignina (Noguerol, 2016).

Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica

En el pretratamiento del material lignocelulósico se busca alterar la estructura macroscópica y microscópica de la biomasa, removiendo hemicelulosa y/o lignina, además de transformar la celulosa cristalina en amorfa. Todo esto, con el objetivo de mejorar la accesibilidad de las enzimas a la celulosa para la posterior hidrólisis enzimática (Dziekońska-Kubczak, Berlowska, Dziugan, Patelski, & Balcerk, 2018). Por lo que, para facilitar el acceso de las enzimas celulosas sobre la celulosa es necesario deslignificar e hidrolizar las hemicelulosas de los materiales lignocelulósicos. Para esto, se debe solubilizar la hemicelulosa, remover la lignina, incrementar la porosidad y descristalinizar la celulosa presente (Jaramillo *et al.*, 2017) (Figura 4).

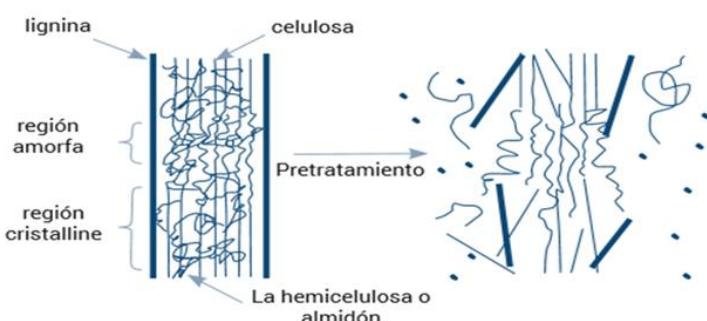


Fig.4. Esquema del cambio estructural del material lignocelulósico luego de un pretratamiento (Ortiz, 2014).

La eficiencia de los pretratamientos a partir de materiales lignocelulósicos depende en alto grado de la remoción de lignina, la cual limita la posterior hidrólisis y fermentación de la celulosa, disminuye la cristalinidad haciendo que sea más accesible a la hidrólisis enzimática y permite solubilizar la hemicelulosa e incrementa el área superficial sobre los residuos, ya que esta depende del tamaño de las partículas y el volumen de los poros (Zulyadi, Saleh, & Sarijo, 2016). Por tanto, si se logra reducir el tamaño de las partículas habrá un incremento del área superficial, lo que permitirá una alta velocidad de hidrólisis enzimática. La biomasa lignocelulósica, se encuentra químicamente compuesta de 35-55 % peso seco de celulosa, 20-40 % peso seco de hemicelulosa y de 10-25 % peso seco de lignina y esto varía según las condiciones climáticas del lugar (Dziekońska-Kubczak *et al.*, 2018). Debido a la composición del material lignocelulósico, la hidrólisis enzimática de esta biomasa es elevadamente limitada por varios factores: cristalinidad de la celulosa, grado de polimerización, contenido de humedad, superficie de contacto disponible y el contenido de lignina.

Para lograr la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica se han propuesto diferentes pretratamientos los cuales se pueden clasificar principalmente en: físicos (mecánicos y térmicos); químicos (empleando ácidos o bases), la combinación entre estos (físicoquímicos) y biológicos (Quintana, 2017).

Pretratamientos físicos: suelen dividirse en dos categorías; mecánicos y térmicos. En los mecánicos, se utilizan las fuerzas de impacto y cizalladura, que conducen a materiales de baja cristalinidad, mayor superficie específica y densidad aparente más alta (Weinrich *et al.*, 2018). Entre estos pretratamientos, cabe mencionar diferentes tipos de moliendas (molino de bolas, martillo, cuchillas, rodillos), así como procesos de molienda e hidrólisis simultáneas. Los pretratamientos de carácter térmico, someten al residuo celulósico a la acción de agentes externos que provocan alteraciones diversas del material de partida. Entre éstos se encuentran los

tratamientos con agua caliente presurizada (termohidrólisis), extrusión e irradiación (ultrasónico y microwave) y explosión al vapor a altas presiones (Lopez, Reyes, Escobar, Garciga, & Romero, 2018).

Pretratamiento mecánico: El objetivo de un pretratamiento mecánico es la reducción en el tamaño de partículas de la biomasa lignocelulósica, así como de la cristalinidad. Una disminución del tamaño de las partículas conduce a un aumento de la superficie disponible y un pequeño grado de polimerización. El incremento de la superficie específica, el descenso del grado de polimerización y el corte, son todos los factores que elevan el rendimiento de la hidrólisis total de la biomasa lignocelulósica (Hernández-Beltrán et al., 2019).

Pretratamiento térmico: durante este pretratamiento la biomasa lignocelulósica se calienta. Si la temperatura aumenta por encima de 150-180 °C, en primera instancia, la hemicelulosa y poco después la lignina, comenzarán a solubilizarse. Esta temperatura de 180 °C es probablemente sólo una indicación, ya que la reactividad térmica de la biomasa lignocelulósica depende en gran medida de su composición. Durante los procesos térmicos una parte de la hemicelulosa se hidroliza y forma ácidos. Estos mismos ácidos se supone siguen catalizando la hidrólisis de la misma (Karimi & Taherzadeh, 2016).

Pretratamientos Químicos: el objetivo fundamental de estos pretratamientos es solubilizar la fracción de lignina y modificar la estructura de las cadenas celulosicas, de manera que sean fácilmente atacables por las enzimas. Entre los más estudiados se encuentran los tratamientos oxidativos, álcalis y ácidos (Reales, Castaño, & Zapata, 2016). La mayoría de los pretratamientos químicos, persiguen la ruptura de los enlaces de hidrógeno en las regiones cristalinas de la fibra, con el objetivo de abrir la estructura, y permitir el paso de los agentes hidrolíticos. En este grupo hay que incluir la utilización de ácidos como H₂SO₄, H₃PO₄, sales como ZnCl₂, y álcalis como NaOH, NH₃, Ca(OH)₂ (Batog, Pieprzyk, Wawro, & Skibniewski, 2016).

Ácido Diluido: El pretratamiento de la biomasa lignocelulósica con ácidos a temperatura ambiente se realiza para mejorar la digestibilidad anaerobia. El objetivo es solubilizar la hemicelulosa, y lograr con esto mejor acceso a la celulosa. El pretratamiento se puede hacer con ácidos diluidos o con ácidos fuertes; la principal reacción que se produce en ambos casos es la hidrólisis de la hemicelulosa, especialmente de xilano que es relativamente estable en ácido. La hemicelulosa solubilizada puede ser objeto de las reacciones hidrolíticas y producir furfural, hidroximetilfurfural y otros productos que pueden inhibir el proceso de digestión anaerobia (Area, 2016). Este ha sido uno de los métodos más estudiados para incrementar la digestibilidad de la biomasa. Se han evaluado ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y ácido sulfúrico, siendo este último el más empleado debido a la facilidad del uso de las fracciones sólida y líquida resultantes del pretratamiento (Matta, Iinguilan, & Muzos; M., 2015). Durante el pretratamiento, se mezcla ácido sulfúrico diluido junto con la biomasa para solubilizar la hemicelulosa presente (Vargas, 2017). La mezcla se calienta con vapor a temperaturas de 140 °C a 215 °C. El tiempo del pretratamiento varía de unos segundos a minutos dependiendo de la temperatura. Con este pretratamiento se puede recuperar más del 80 % de la glucosa presente en la biomasa (Sun, Shaolong, Cao, & Sun, 2016).

Pretratamiento alcalino: las primeras reacciones que tienen lugar son la solvatación y saponificación. Esto provoca que la biomasa se expanda, lo cual la hace más accesible a las enzimas y bacterias. En altas niveles de pH, ocurre una hidrólisis alcalina, lo cual conlleva a la degradación y descomposición de polisacáridos. En consecuencia, se observa que la biodegradabilidad de la biomasa lignocelulósica está limitada por varios factores como la cristalinidad de la celulosa, el área superficial y el contenido de lignina (Vargas, 2017).

Una vez realizado el pretratamiento se obtienen dos fracciones: una fracción sólida insoluble en agua la cual contiene celulosa y lignina; y la otra es líquida compuesta de hemicelulosa (Wunna, nakasaki, Auresenia, Abella, & Gaspillo, 2017). Posteriormente se realiza la hidrólisis de cada una de las fracciones (celulósica y hemicelulósica) para obtener los monómeros; hexosas y pentosas respectivamente, los cuales son la materia prima de diferentes productos químicos (Dziekońska-Kubczak et al., 2018).

Pretratamiento oxidativo: Su principal función es promover la ruptura de los núcleos aromáticos, sustitución electrofílica, dislocación de cadenas laterales y apertura de enlaces éter alquil-arílicos. En este, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se convierte en radicales hidroxilo (OH⁻) que actúa sobre la biomasa, pero el mecanismo es menos selectivo por lo que las proporciones de hemicelulosa se pierden durante el proceso (Abraham et al., 2020). El ozono también ha sido utilizado para degradar la lignina y la hemicelulosa de numerosos materiales lignocelulósicos como en la paja de trigo, bagazo pino y algodón. La degradación se limita a la lignina, ya que la hemicelulosa es atacada ligeramente y la celulosa apenas se ve afectada (Morales, 2015).

Pretratamiento Fisicoquímico: Presenta un enfoque combinado con el que se rompen los enlaces de hidrógeno e incrementa el área superficial a temperatura entre 50- 250 °C, el tiempo es un factor decisivo pues si la exposición al calor es prolongada se forma mayor cantidad de inhibidores (Espinosa et al., 2021). En esta categoría se encuentran agrupados la mayor parte de los pretratamientos. El de explosión con vapor, agua caliente, explosión con amonio (AFEX) y organosolv (Batog et al., 2016).

Tratamiento con explosión a vapor: se producen cambios físicos y químicos en el material lignocelulósico. Los cambios físicos son el incremento de la superficie específica y la reducción del grado de polimerización de la celulosa debido a la desfibración de las partículas. Los cambios químicos son la hidrólisis parcial y solubilización de la hemicelulosa y la degradación de la lignina en productos de bajo peso molecular (Rodríguez., 2016). En la conversión de celulosa se presenta despolimerización por hidrólisis y se obtienen oligosacáridos, los cuales presentan una condensación retro-aldólica, para transformarse en furfurales y ácidos carboxílicos (Hernández-Beltrán et al., 2019). El sustrato es sometido a presiones mayores que las atmosféricas que van de 10 a 45 atm y a altas temperaturas que oscilan entre 180-260 °C con un tiempo de contacto de uno a varios minutos, dependiendo del material con el que se trabaje. Después de finalizada la etapa de contacto con el vapor a presión, el material se desfibra ampliamente (Dziekońska-Kubczak et al., 2018).

Tratamiento con agua líquida caliente: es un método de usualmente aplicado a los residuos agrícolas, que resulta en una mayor recuperación de azúcares de hemicelulosa y baja producción de inhibidores de la fermentación de los hidrolizados que en el de explosión de vapor (Rodríguez., 2016). Los pretratamientos hidrotérmicos son procedimientos que intentan modificar la estructura lignocelulósica mediante el uso de agua sometida a altas temperaturas en un reactor cerrado. Las condiciones típicas incluyen temperaturas alrededor de 200°C por pocos minutos (Dziekońska-Kubczak et al., 2018).

En un ambiente hidrotérmico es frecuente que la presión endógena sea suficiente para mantener el agua en fase líquida. En tales condiciones, el agua actúa de manera simultánea como disolvente, catalizador y reactante. Este método también logra el fraccionamiento selectivo de cada uno de los tres componentes poliméricos que componen la biomasa lignocelulósica (Vargas, 2017). Por un lado, se obtiene una fracción soluble en agua que presenta hemicelulosa, por otro, una masa que contiene la lignina y la celulosa, de la cual la lignina se puede extraer con soda diluida o etanol, donde permanece la celulosa en forma insoluble (Rodríguez., 2016).

Tratamiento de explosión con ammonio (AFEX): este método combina el efecto físico del contacto del vapor con la biomasa a alta temperatura y el efecto químico de la degradación de la estructura lignocelulósica por parte del amoníaco, dando como resultado la degradación de la lignina, la solubilización de la hemicelulosa, la ruptura los enlaces lignina-carbohidratos, la reducción de la cristalinidad de la celulosa y el incremento de la porosidad de la matriz lignocelulósica, mejorando el rendimiento de monosacáridos durante la hidrólisis enzimática (Hernández-Beltrán et al., 2019). El pretratamiento AFEX es especialmente recomendado para biomassas que tienen un contenido de lignina menor al 15 %, obteniendo rendimientos de hidrólisis de celulosa y hemicelulosa del 90 %; mientras que, para biomassas con un contenido de lignina mayor, solo se obtiene rendimientos de hidrólisis inferiores al 50 % (Palomar et al., 2015).

Tratamiento con organosolv: son procesos químicos basados en el uso de disolventes orgánicos, utilizados para la producción de pastas celulosicas, con el objetivo de individualizar las fibras contenidas en los materiales lignocelulósicos. De forma genérica consisten en la cocción de la materia prima en una disolución con el fin de que buena parte de la lignina se solubilice y las fibras se disgreguen entre sí, liberándose en forma de suspensión (Hernández-Beltrán et al., 2019).

Se emplea una mezcla de solventes orgánicos o acuosos junto con un catalizador ácido (clorhídrico o sulfúrico) para romper los enlaces internos de la lignina y la hemicelulosa. Algunos de los solventes orgánicos que se pueden utilizar son el metanol, etanol, acetona y el etilenglicol (Zhu et al., 2016).

Pretratamientos biológicos: estos pretratamientos consisten en someter a la biomasa lignocelulósica a la acción de microorganismos que degradan la lignina y la hemicelulosa, con lo que se destruyen las estructuras que protegen a la celulosa y hacen más accesible al ataque hidrolítico (Lopez et al., 2018). El tratamiento de la biomasa con microorganismos se basa en la capacidad que tienen los hongos y bacterias de producir enzimas que degraden la lignina y hemicelulosa presente en la biomasa (Uscanga et al., 2015) y se muestra como una técnica prometedora, ya que cuenta con varias ventajas: no necesita de reactivos químicos, bajo costo energético, y en general sus mecanismos, así como sus condiciones de trabajo son amigables al medio ambiente (Morales, 2015).

Principales ventajas y desventajas del pretratamiento biológico

Las diferentes variantes del pretratamiento biológico presentan ventajas y desventajas reportadas en la literatura (Tabla 1). Ofrece ventajas únicas en comparación con los procesos químicos o físicos, ya que es afín con el medio ambiente y no causa contaminación, ni necesita equipos especiales y posee un bajo requerimiento energético (Martínez-Hernández, 2017; Nges *et al.*, 2016; Salihu & Alam, 2016; Wagner *et al.*, 2018). Como muestra la tabla los pretratamientos biológicos han sido aplicados en diversos estudios a diferentes sustratos lignocelulósicos, en sistemas anaerobios o aerobios y en la aplicación de diferentes microorganismos deficientes y han demostrado que da como resultado una degradación mejorada y un aumento en la producción de metano; por lo que se investiga ampliamente a escala de laboratorio y a gran escala para mejorar la biodegradabilidad de las materias primas lignocelulósicas, donde los contenidos de hemicelulosa y celulosa son superiores al 30% (De Menna *et al.*, 2016; Wagner *et al.*, 2018; Yu, Zhang, Li, Zhao, & Kang, 2013). Otra de las ventajas que presenta el empleo de este tipo de pretratamiento es que permite reducir el autoconsumo eléctrico, gracias a una mejora de la fluidez durante el proceso de mezcla (De Menna *et al.*, 2016).

Sin embargo, una de las dificultades que muestra esta técnica, es que estos microorganismos presentan actividad celulolítica, por lo que consumen la celulosa preferentemente a la lignina. Además, la lentitud a la que se desarrollan estos procesos, constituye una desventaja (Salihu & Alam, 2016; Yunqin, Dehan, & Lishang, 2010); como es el caso de una tasa de hidrólisis demasiado lenta (Nges *et al.*, 2016).

El pretratamiento biológico utilizando enzimas, podría decirse que la mayor desventaja que presenta es el alto costo de obtención de las mismas lo cual hace sea económicamente inviable a escala industrial (Kumar & Murthy, 2011; Nges *et al.*, 2016; Parawira, 2012).

Los consorcios aislados de suelo como los llamados microorganismos eficientes o enriquecidos, han sido utilizados para la descomposición acelerada de diferentes biomasas. Estos microorganismos, se han aplicado en diferentes contextos como las actividades pecuarias, rellenos sanitarios, vertederos, tratamiento de los suelos, de aguas y aguas residuales entre otros. La base de la tecnología de microorganismos eficientes es la mezcla de diferentes tipos de microorganismos, todos ellos benéficos, que poseen propiedades de fermentación, producción de sustancias bioactivas, competencia y antagonismo con patógenos. Esto ayuda a mantener un equilibrio natural entre los microorganismos que conviven en el entorno, que trae efectos positivos sobre la salud y bienestar del ecosistema (Romero López & Vargas Mato, 2017).

Tabla 1. Ventajas, desventajas y resultados significativos reportados del pretratamiento biológico

Pretratamiento Biológico	Procedimiento	Sustratos empleados	Ventajas	Desventajas y Desafío Económico	Resultados más significativos
Bioaumentación	Uso consorcios microbianos enriquecidos (Tsapekos, Koulias, et al., 2017)	Biomasa lignocelulósica (Öner et al., 2018) Residuos de maíz (Pérez Del Toro, Pérez Medina, Hongos del rumen anaeróbico (Yıldırım, Ince, Aydin, & Ince, 2017) Desechos agrícolas (Tsapekos, Angelidaki, et al., 2017) Abono animal (Yıldırım et al., 2017) Microalgas (Lavrič et al., 2017)	No contamina el medio ambiente. No requiere área adicional, ni maquinaria pesada (Penissi, 2018)	Inoculación a gran escala. Competencia microbiana. Limitaciones con las condiciones climáticas. (Öner et al., 2018)	Método muy efectivo para mejorar el rendimiento de la Digestión Anaerobia. (Lianhua et al., 2018)
Pretratamiento Biológico con Bacterias	Uso consorcios microbianos enriquecidos Principalmente la Familia de <i>Bacillus</i> sp (Wagner et al., 2018)	Biomasa lignocelulósica (Li, 2017) Pasto(Rodriguez, Alaswad, Benyounis, & Olabi, 2017) Desechos orgánicos (Salihu & Alam, 2016) Efluentes acuícolas (González-Hermoso & Segovia, 2017) Plumas de pollo (Ahmed, Shamim, Talukdar, & Parvin,	No contamina el medio ambiente. No requiere de equipos especiales. Bajo requerimiento energético. (Martínez-Hernández, 2017; Nges et al., 2016; Salihu & Alam, 2016; Wagner et al., 2018)	Actividad celulolítica microbiana (Yang et al., 2018) Lentitud en el desarrollo del proceso Tasa de Hidrólisis demasiado lenta. (Zhang, Yu, Wang, & Li, 2018)	Mejora en un 36% la producción CH ₄ (Fotidis et al., 2017)
			Efectos positivos sobre la salud y bienestar del ecosistema (Romero López & Vargas Mato, 2017)		Aumento en el rendimiento CH ₄ .(González-Hermoso & Segovia, 2017; Yunqin et al., 2010)
					Aumento 95% CH ₄ (Yang et al., 2018)

			2018) Queratina (Lianhua et al., 2018)	
Pretratamiento biológico con Hongos	Hongos de podredumbre blanca, blanda y parda (Carrazana Lee, Álvarez Bustamante, Quesada Rodríguez, & Hidalgo Cerito, 2018)	Bagazo de Caña (da Silva Machado & Ferraz, 2017). Desechos de cocina, residuos de jardín, recortes de césped, follaje y pellets de madera (Lalak, Kasprzycka, Martyniak, & Tys, 2016) Rastrojo de maíz, madera dura y madera de caucho (Young et al., 2018)	Alternativas económicamente más viables y menos dañinas para el medio ambiente (González et al., 2018).	Optimización del contenido de humedad durante el tratamiento (Lowe, 2018) Tasa de Hidrólisis lenta. (Buffone et al., 2018; Ngés et al., 2016)
Pretratamiento Biológico con Enzimas (Enzimático)	Hidrólisis con Enzimas industriales: (celulasa, hemicelulasa, proteasas, amilasas y lipasas)	Residuos de alimentos, ensilaje de maíz, de pasto y de centeno (Quevedo, Guzmán, Oliva, Méndez, & Delgado, 2018; Raper, Stephenson, Anderson, Fisher, & Soares, 2018) Residuos agrícolas (Martínez-Hernández, 2017) Pasta y lodo de papel (Bonilla et al., 2018) Microalgas (Passos, Hom-Diaz, Blanquez, Vicent, &	Beneficios medioambientales (Ngés et al., 2016) No requiere de equipos costosos o reactivos químicos (Tang et al., 2018)	Alto costo de las Enzimas. (Brémond, de Buyer, Steyer, Bernet, & Carrere, 2018) Velocidad de la hidrólisis (Salihu & Alam, 2016)



Ferrer, 2016)

Entre todas las tecnologías de pretratamiento mencionados anteriormente, el biológico ha mostrado una gran mejora en la producción de biogás(Ahmed et al., 2018; Brémond et al., 2018; Montgomery & Bochmann, 2017).

Un ejemplo de la gran utilidad y resultados relevantes del biológico, es una investigación reciente, donde se probaron cuatro tipos de pretratamientos (químico, físico, químicofísico y biológico). Entre los resultados de mayor relevancia estuvo que el biológico, presentó la mayor remoción de N-NO₂, N-NO₃ y la mayor producción de biogás; por lo que la aplicación de un tratamiento en los efluentes acuícolas puede mejorar los procesos de desnitrificación y digestión anaerobia (González-Hermoso & Segovia, 2017).

Dentro de los principales microorganismos reportados se encuentran la familia de los *Bacillus* sp. La adición de estos para aumentar la digestión anaerobia mostró un incremento de la producción de metano de 95% respecto al control. Por otra parte al añadir micronutrientes en conjunto con este tipo de microorganismos se observó una mejora en la producción de biogás de un 167% (Salihu & Alam, 2016).

Entre los microorganismos que intervienen en la degradación anaerobia existen complejas relaciones ecológicas, mediadas por sus requerimientos metabólicos y sus particularidades fisiológicas; las cuales influyen en la composición de gases del biogás (P. R. Ortiz et al., 2018; Rodriguez et al., 2017; Strang et al., 2017; Wojcieszak, Dziewit, & Drewniak, 2017). Es por ello, que el pretratamiento biológico utiliza microorganismos (principalmente bacterias y hongos) para degradar la biomasa recalcitrante y mejorar la producción de biogás.

Los más eficaces en este tipo de pretratamiento son los de la podredumbre blanca, blanda y parda; los cuales son capaces de generar celulosas, hemicelulosas y enzimas degradativas de la lignina, tales como; ligninasas, lignina peroxidases, polifenoloxidases, lacasas y enzimas reductoras de quinonas (Ferrer & Pérez, 2010; Lalak et al., 2016); las que aumenta la digestibilidad de la biomasa (Aydin, Yıldırım, Ince, & Ince, 2017; Lalak et al., 2016). Respecto a los patrones de producción enzimática de hongos de podredumbre blanca, en la literatura se incluyen tres categorías de hongos para la degradación de la lignina; dentro de estos grupos tenemos como primera categoría las de peroxidasa de lignina y manganeso, como es el caso de *P. chrysosporium* y *Phlebia radiata*, las de segunda encontramos los que poseen las enzimas manganeso peroxidasa-lacasa, en este caso la especie *Dichomitus squalens* y *Rigidoporus lignosus*, y por última categoría el grupo de lignina peroxidasa-lacasa; el cual lo constituyen la *Phlebia ochraceo fulva* y *Junghuhnia separabilima*. También se encuentra el hongo *ascomycetal* de podredumbre blanda (*Trichoderma viride*), el cual se ha aplicado a desechos de cocina, residuos de jardín, recortes de césped, follaje y pellets de madera en un proceso aeróbico ascendente antes de la digestión anaerobia (Mutschlechner, Illmer, & Wagner, 2015). Los resultados obtenidos en este estudio mostraron un aumento de tres veces en el rendimiento de metano con el uso del pretratamiento biológico.

En un pretratamiento biológico realizado aplicando hongos para la obtención de biogás, se pudo observar como uno de los principales resultados que la biomasa pretratada al 65% produjo un 120% más de producción de biogás y un 134% más de rendimiento de metano, en comparación con el control (Lalak et al., 2016). Las técnicas biológicas que usan hongos de podredumbre blanca y sus extractos de enzimas se consideran alternativas económicamente más viables y menos dañinas para el medio ambiente en comparación con otras variedades de hongos (Van Kuijk, Sonnenberg, Baars, Hendriks, & Cone, 2015). Entre los métodos biológicos, el tratamiento fúngico por hongos de pudrición blanca es decir: *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Flammulina velutipes*, es la tecnología más efectiva y ampliamente utilizada para reducir la recalcitrancia de la biomasa lignocelulósica y aumentar la hidrólisis de los carbohidratos (Carrazana Lee et al., 2018; Illade et al., 2018). Varios estudios han demostrado una producción mejorada de biogás después del pretratamiento fúngico de varias materias primas (Li, 2017; Martínez-Hernández, 2017; Ramnanan & Pound, 2017). Sin embargo, el contenido de humedad es un factor clave para el crecimiento de hongos en el cultivo en estado sólido; debido a que el agua es fundamental para la transferencia de nutrientes. Es por ello, que la optimización del contenido de humedad durante el tratamiento de los hongos es necesaria para degradar efectivamente la lignina y, en consecuencia, descomponer la complicada estructura de la biomasa lignocelulósica y con esto mejorar el rendimiento del biogás(Fotidis et al., 2017; Lalak et al., 2016; Pantoja-Matta, Cuatin-Inguilán, & Muñoz-Muñoz, 2015).

El pretratamiento enzimático es uno de los métodos más prometedores en cuanto al aumento de la velocidad de la hidrólisis de desechos orgánicos sometidos a procesos de digestión anaerobia (Salihu & Alam, 2016). La aplicación directa de enzimas ha sido elogiada principalmente debido a los beneficios ambientales, pero su alto costo en cuanto a la producción de estas sigue siendo una barrera esencial para la implementación de este tipo de pretratamiento a gran escala (Nges et al., 2016; Parawira, 2012).

Las enzimas comerciales (celulasa, hemicelulasa, proteasas, amilasas y lipasas) también son adecuadas para una hidrólisis efectiva de la biomasa compleja (Subitha, Lillykutty, Sajith, Kandamuthan, & Usha, 2016; Vargas-Vargas, Jimenez-Canizalez, Trujillo-Abella, Ordoñez-Chavarro, & A, 2019; Yang et al., 2018). Los consorcios enzimáticos (enzimas comerciales múltiples) son más efectivas que las enzimas comerciales individuales porque actúan sinérgicamente para permitir la conversión eficiente del sustrato mediante la acción

concertada de varias especies. Aunque estas enzimas comerciales son muy costosas (da Silva Machado & Ferraz, 2017; Gummin et al., 2017; Penissi, 2018), pero estas pueden producirse *in situ* a partir de materias primas baratas, lo que hace que el proceso sea rentable (Ahmed et al., 2018).

La adición de una amplia variedad de productos enzimáticos que comprenden celulasas, hemicelulasas, xilanasa, pectinasa, lipasa, lactasa y otros, ya sea solos, o en combinación con sistemas de DA, puede aumentar la biodisponibilidad de las fuentes de carbono, produciendo energía actuando directamente en ambos pre-hidrólisis e hidrólisis no solo de cultivos energéticos y residuos agrícolas, sino también de residuos de lodos y grasas (Oliva-Merencio, Pereda-Reyes, Schimpf, Koehler, & Silva, 2015).

En un estudio de pretratamiento enzimático realizado a residuos agrícolas como sustrato, se obtuvo un incremento por encima del 100% de rendimiento específico de biogás con inóculo porcino, en comparación con el mismo pretratamiento pero con inóculo vacuno (Martínez-Hernández, 2017). Esto puede indicar que además del sustrato que pueda emplearse, el inóculo, juega un papel importante en la producción de biogás; que, en este caso, el porcino es rico en nitrógeno, nutrientes y contenido proteico.

Según un estudio realizado por Brulé, en la etapa de hidrólisis enzimática se obtuvo una eficiencia pobre con la adición de enzimas en sustratos agrícolas (Brulé, 2014).

Ploechl et al. (2010) realizó un pretratamiento biológico a través del empleo de enzimas donde se trabajó el impacto de las enzimas hidrolíticas como forma prometedora de mejorar la fluidez en el proceso de DA en determinados materiales como: residuos de alimentos, ensilaje de maíz, de pasto y de centeno. En este caso, se arribó a la conclusión de la gran utilidad de las enzimas en este tratamiento y se probó que el uso de estas, mejora la fluidez del proceso y, por ende, el aumento de los rendimientos del biogás. Este autor plantea además que aunque en la mayoría de las mediciones hubo una consecuencia visible del tratamiento enzimático sobre la fluidez de los materiales, este. En un pretratamiento biológico realizado con el fin de valorar el efecto de una enzima en la DA del ensilaje de maíz; no tuvo un impacto significativo en la producción de biogás después de un período de digestión de 35 días (Buffone et al., 2018).

Una investigación elaborada por De Menna et al. (2016), evaluó la producción potencial de biogás, a partir de subproductos agrícolas de alcachofa en cerdeña con la con aplicación de enzimas catalíticas; donde estas demostraron tener algunos efectos beneficiosos en términos de disponibilidad de biometano.

El primer estudio en determinar la consecuencia de la actividad catalítica y la carga orgánica de las enzimas para evaluar el pretratamiento enzimático fue publicado por Bonilla et al. (2018). En esta investigación se valoró el mismo sobre la digestibilidad anaeróbica de la pasta y lodo de papel; y se propuso un enfoque nuevo y riguroso para valorar el influencia de este en la DA. Como resultado más significativo fue la mejora del proceso anaeróbico a través del uso de enzimas; además de que se observó un aumento el rendimiento de biogás hasta un 26% con la proteasa de *B. licheniformis* (Bonilla et al., 2018). Como afirma este autor, las enzimas poseen un gran potencial para mejorar la digestibilidad anaeróbica, pero es necesario realizar más estudios sobre las condiciones óptimas y las posibles sinergias con otros pretratamientos.

En resumen, cuando se habla de residuos agrícolas se refiere a todo producto generado por determinada actividad, ya sea por la intervención del hombre o por las actividades desarrolladas por otros organismos vivos. Desde el momento en que comienzan a acumularse en el medio ambiente ya sea por la velocidad con la que se generan, o por la naturaleza química de estos, hace que se dificulte su descomposición e incorporación a los ciclos naturales, comenzando hacer un problema ambiental. Actualmente en Cuba no existe un mecanismo para la disposición y uso final de los residuos agrícolas a pesar, de que se han realizado estudios del potencial bioenergético aprovechable a partir del uso de los mismos. Debido a que la biomasa lignocelulósica principalmente contiene hemicelulosa y celulosa cubierta por una red de lignina, la cual es resistente a los ataques enzimáticos y microbianos. Esto hace que la etapa de hidrólisis sea la etapa limitante, por lo tanto, una de las soluciones a estos problemas sería la aplicación de un pretratamiento para romper la estructura y reducir la cristalinidad de las lignocelulasas. De esta manera se puede emplear cada una de las fracciones para la obtención de compuestos con valor agregado con el fin de mejorar la cantidad y calidad de biogás obtenido. Teniendo en cuenta el análisis de las ventajas y desventajas analizadas anteriormente de cada uno de los pretratamientos, se puede decir que el biológico ofrece ventajas únicas en comparación con los procesos químicos o físicos, ya que es afín con el medio ambiente y no causa contaminación, ni necesita equipos especiales y posee un bajo requerimiento energético y se ha demostrado que da como resultado una degradación mejorada, propiedades de deshidratación del lodo y un aumento en la producción de metano; por lo que se investiga ampliamente a escala de laboratorio y a gran escala (Wagner et al., 2018; Yu et al., 2013).

CONCLUSIONES

La producción de biogás a partir de residuos lignocelulósicos es una oportunidad para convertir recursos biomásicos en energía renovable. La compleja y recalcitrante naturaleza de la celulosa, hemicelulosa y lignina dificultan su conversión a biogás vía digestión anaerobia, de ahí la necesidad de introducir un paso de

pretratamiento previo a la digestión anaerobia. La aplicación de pretratamientos a los materiales lignocelulósicos permite disociar el complejo formado por la hemicelulosa, celulosa y lignina; de esta manera se puede emplear cada una de las fracciones no solo para la digestión anaerobia sino también como materia prima para la obtención de diversos productos químicos. Los pretratamientos se clasifican principalmente en físicos (mecánicos y térmicos), químicos (ácidos o básicos), fisicoquímicos (combinación de físicos y químicos) y los biológicos, y su selección dependerá de varios factores como el costo energético, económico, necesidad de químicos y su efecto sobre la biomasa que se estudia. Los pretratamientos biológicos son muy utilizados para mejorar procesos; es muy importante que se garantice una buena hidrólisis del sustrato para de esta forma no solo obtener productos de alto nivel agregado, sino para también contribuir a la biodegradación de compuestos complejos que constituyen contaminantes del medio ambiente cuando son desechados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, A., Mathew, A., K., P., H., , Choi, O., Sindhu, R., Parameswaran, B., . . . Sang, B. I. (2020). Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass., *Bioresource Technology*, 301, 1-13.
- Aguilera, E. A. (2016). Producción de biogas a partir de Biomasa. Revista Científica de FAREM-Estelí. Medio ambiente, tecnología y desarrollo humano.(17).
- Ahmed, R., Shamim, K., Talukdar, H., & Parvin, S. (2018). Light Microscopy for Teaching-Learning in Histology Practical in Undergraduate Medical Education of Bangladesh-a Teachers' Perspective. *South-East Asian Journal of Medical Education*, 12(1).
- Area, M. C. (2016). La biorrefinería como ejemplo de producción sustentable en los sectores arrocero y forestal Bioeconomía Argentina.
- Aydin, S., Yıldırım, E., Ince, O., & Ince, B. (2017). Rumen anaerobic fungi create new opportunities for enhanced methane production from microalgae biomass. *Algal Research*, 23, 150-160.
- Ayeni, A. O., Adeeyo, O. A., Oresegun, O. M., & Oladimeji, T. E. (2015). Compositional analysis of lignocellulosic materials: Evaluation of an economically viable method suitable for woody and non-woody biomass. *American Journal of Engineering Research*, 4(4), 14-19.
- Batog, J., Pieprzyk, D., Wawro, A., & Skibniewski, Z. (2016). Chemical processes (acidic and alkaline) in saccharification of sorghum biomass for biofuel production. *CELLULOSE CHEMISTRY AND TECHNOLOGY*, 50(3-4), 397-400.
- Bau, M. G. (2016). Caracterización química de la biomasa procedente de las hojas, pseudotallo, raquis y pseudopecíolo de la planta de banano y su relación con el poder calorífico. Universidad de Cuenca,
- Bonilla, S., Choolaei, Z., Meyer, T., Edwards, E. A., Yakunin, A. F., & Allen, D. G. (2018). Evaluating the effect of enzymatic pretreatment on the anaerobic digestibility of pulp and paper biosludge. *Biotechnology reports*, 17, 77-85.
- Brémond, U., de Buyer, R., Steyer, J.-P., Bernet, N., & Carrere, H. (2018). Biological pretreatments of biomass for improving biogas production: an overview from lab scale to full-scale. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, 583-604.
- Brulé, M. (2014). The effect of enzyme additives on the anaerobic digestion of energy crops.
- Buffone, I., Dejter, M., Fortunatti, E., García Elliot, F., Irazabal, C., Marlía, R., . . . Speciale, G. (2018). Caracterización de la consulta por intoxicación medicamentosa en los adolescentes en el Hospital Municipal de Bahía Blanca, Buenos Aires. *Archivos argentinos de pediatría*, 116(4), 279-282.
- Carrazana Lee, A., Álvarez Bustamante, G., Quesada Rodríguez, M., & Hidalgo Cerito, Y. (2018). Dificultad y discriminación de exámenes ordinarios de la asignatura Célula, Tejidos y Sistema Tegumentario en Ciencias Básicas. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 17(2), 278-289.
- da Silva Machado, A., & Ferraz, A. (2017). Biological pretreatment of sugarcane bagasse with basidiomycetes producing varied patterns of biodegradation. *Bioresource technology*, 225, 17-22.
- De Menna, F., Malagnino, R., Vittuari, M., Molari, G., Seddaiu, G., Deligios, P., . . . Ledda, L. (2016). Potential biogas production from artichoke byproducts in Sardinia, Italy. *Energies*, 9(2), 92.
- Dziekońska-Kubczak, U., Berlowska, J., Dziugan, P., Patelski, P., & Balcerk, M. (2018). Comparación de la explosión de vapor, ácido diluido, y el álcali . Pretratamientos en enzimática de sacarificación y fermentación de madera dura Serrín 13(3).
- Espinosa, A. M., López, L. M., & Casdello, N. L. (2021). Pretreatment of lignocellulosic biomass: A brief review of the principal methods applied. 48, 1-12.
- Fernandez, R. (2017). Estudio de la obtención de biotetanol a partir de diferentes tipos de biomasa lignocelulósica. Matriz de reacciones y optimización., Universidad de Cantabria,

- Ferrer, Y., & Pérez, H. (2010). Los microorganismos en la digestión anaerobia y la producción de biogás. Consideraciones en la elección del inóculo para el mejoramiento de la calidad y el rendimiento. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 43(1).
- Fotidis, I. A., Treu, L., & Angelidaki, I. (2017). Enriched ammonia-tolerant methanogenic cultures as bioaugmentation inocula in continuous biomethanation processes. *Journal of Cleaner Production*, 166, 1305-1313.
- Galiwango, E., Rahman, N. R., Marzouqi, A., Omar, M., & Khaleel, A. (2018). Klason Method: An Effective Method for Isolation of Lignin Fractions from Date Palm Biomass Waste. *Chemical and Process Engineering Research*, 57.
- Gallardo, M. G., Ortiz, V. G., Gómez, C., Moreno, H., & Gónzalez, A. (2017). Cartera de necesidades de innovación y desarrollo tecnológico
- González, M., A., Curbelo, A., A., Melo, H., A. I., , & Reyes, A. M. (2014). Bioenergía: Fuentes, conversión y sustentabilidad. (J. M. R. Martínez & E. E. S. Lora Eds.). Red Iberoamericana de Aprovechamiento de Residuos Orgánicos en Producción de Energía.
- González-Hermoso, J. P., & Segovia, M. (2017). Efecto de cuatro pretratamientos en la digestión anaeróbica y la remoción de nutrientes de efluentes, de un sistema de recirculación acuícola. *Latin american journal of aquatic research*, 45(2), 276-292.
- González, M. L., Román, M. R. E., Acebey, L. L., Aguilar, M. E. T., Almodovar, M. V., & León, Y. S. (2018). Intoxicación por sustancias metahemoglobinizantes. Algoritmo de actuación en la atención primaria y secundaria.
- Gummin, D., Mowry, J., Spyker, D., Brooks, D., Fraser, M., & Banner, W. (2017). 2016 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 34th Annual Report. *Clinical Toxicology*, 55(10), 1072-1254.
- Haslinger, S., Hietala, S., Hummel, M., Maun, S. L., & Sixta, H. (2019). Solid-state NMR method for the quantification of cellulose and polyester intextile blends. *Carbohydrate Polymers*, 207, 11-16.
- Hernández-Beltrán, J. U., Delira, I. O., Cruz-Santos, M. M., Saucedo-Luevanos, A., Hernández-Terán, F., & Balagurusamy, N. (2019). Insight into Pretreatment Methods of Lignocellulosic Biomass to Increase Biogas Yield: Current State, Challenges, and Opportunities. *Applied sciences*, 9.
- Illade, L., Hernandez-Marques, C., Cormenzana, M., Lassaletta, Á., Catalán, M. A., Ruano, D., . . . López, L. M. (2018). Tumor de Wilms: revisión de nuestra experiencia en los últimos 15 años. Paper presented at the Anales de Pediatría.
- Jaramillo, D., Morales, S. P., & Diaz, J. C. (2017). Chemical pretreatments evaluation on lignocellulosic materials. 25(4), 733-743.
- Karimi, K., & Taherzadeh, M. J. (2016). A critical review on analysis in pretreatment of lignocelluloses: Degree of polymerization, adsorption/desorption, and accessibility. *Bioresource Technology*, 203, 348–356.
- Kucharska, K., Rybarczyk, P., Holowacs, I., Lukajtis, R., Glinka, M., & Kaminski, M. (2018). Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes. *Molecules*, 2937.
- Kumar, D., & Murthy, G. S. (2011). Impact of pretreatment and downstream processing technologies on economics and energy in cellulosic ethanol production. *Biotechnology for biofuels*, 4(1), 27.
- Lalak, J., Kasprzycka, A., Martyniak, D., & Tys, J. (2016). Effect of biological pretreatment of Agropyron elongatum 'BAMAR' on biogas production by anaerobic digestion. *Bioresource technology*, 200, 194-200.
- Lavrič, L., Cerar, A., Fanedl, L., Lazar, B., Žitnik, M., & Logar, R. M. (2017). Thermal pretreatment and bioaugmentation improve methane yield of microalgal mix produced in thermophilic anaerobic digestate. *Anaerobe*, 46, 162-169.
- Law, J. K., Thome, P. A., Lindeman, B., Jackson, D. C., & Lidor, A. O. (2018). Student use and perceptions of mobile technology in clinical clerkships—Guidance for curriculum design. *The American Journal of Surgery*, 215(1), 196-199.
- Li, C. (2017). Biogas Production from Lignocellulosic Biomass: Impact of pre-treatment, co-digestion, harvest time and inoculation: Lund University.
- Lianhua, L., Ying, L., Yongming, S., Zhenhong, Y., Xihui, K., Yi, Z., & Gaixiu, Y. (2018). Effect of bioaugmentation on the microbial community and mono-digestion performance of *Pennisetum* hybrid. *Waste management*, 78, 741-749.
- Lopez, L. M., Reyes, I., Escobar, R., Garciga, J., & Romero, O. (2018). Effect of the application of pre-treatment methods in the anaerobic digestion process of the lignocellulosic biomass. .
- Lowe, A. J. (2018). E-learning in medical education: One size does not fit all. *Anatomical sciences education*, 11(1), 100-101.
- Martínez-Hernández, C. M. (2017). Study of Enzymes Pre-Treatments in Biomasses Dedicated to Biogas Production. *Revista de Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 26(2), 55-64.

- Matta, A. J., Iinguilan, M. F., & Muzos; M. (2015). Efecto del pretratamiento químico y enzimático en la deslignificación de biomasa agroindustrial típica del Cauca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(1), 45-53.
- Montgomery, L., & Bochmann, G. (2017). Pretreatment of feedstock for enhanced biogas production. IEA Bioenergy. 2014. In.
- Morales, S. (2015). Hidrólisis ácida de la celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos. Universidad Autónoma de Madrid,
- Mutschlechner, M., Illmer, P., & Wagner, A. O. (2015). Biological pre-treatment: Enhancing biogas production using the highly cellulolytic fungus *Trichoderma viride*. *Waste management*, 43, 98-107.
- Navabi, S. M., Navabi, J., Aghaei, A., Shaahmadi, Z., & Heydari, R. (2018). Mortality from aluminum phosphide poisoning in Kermanshah Province, Iran: characteristics and predictive factors. *Epidemiology and health*, 40, e2018022. doi:10.4178/epih.e2018022
- Nges, I. A., Li, C., Wang, B., Xiao, L., Yi, Z., & Liu, J. (2016). Physio-chemical pretreatments for improved methane potential of *Miscanthus lutarius-parius*. *Fuel*, 166, 29-35.
- Noguerol, R. (2016). Valirizacion de la lignina
- Oliva-Merencio, D., Pereda-Reyes, I., Schimpf, U., Koehler, S., & Silva, A. J. d. (2015). Cellulase effect on anaerobic digestion of maize silage under discontinuous operation. *Engenharia Agrícola*, 35(5), 951-958.
- Öner, B. E., Akyol, Ç., Bozan, M., Ince, O., Aydin, S., & Ince, B. (2018). Bioaugmentation with *Clostridium thermocellum* to enhance the anaerobic biodegradation of lignocellulosic agricultural residues. *Bioresource technology*, 249, 620-625.
- Ortiz. (2014). Tratamientos aplicables a materilaes lignocelulosicos para la obtencion de etanol y productos químicos Revista tecnologica, 13(1), 39-44.
- Ortiz, P. R., Lárraga, J. E. R., Limas, E. d. C. A., Rodríguez, L. H., De la Garza Requena, F. R., & Meza, B. I. C. (2018). Bioestimulación y Biorremediación de recortes de perforación con hidrocarburos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(2), 249-262.
- Palomar, L., Bautista, A. G., Alpirez, G., Cervantes, L., Ramos, R., Uscanga, E., . . . Velazquez, A. (2015). Determinación simplificada del contenido de lignina en paja de trigo por método volumétrico y su caracterización química. *Ciencia y Tecnología*, 15.
- Pantoja-Matta, A. J., Cuatin-Inguilán, M. F., & Muñoz-Muñoz, D. (2015). Effect of pretreatment chemical and enzymatic on deslignification of typical Agroindustrial biomass of department Cauca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(1), 45-53.
- Parawira, W. (2012). Enzyme research and applications in biotechnological intensification of biogas production. *Critical reviews in biotechnology*, 32(2), 172-186.
- Passos, F., Hom-Diaz, A., Blanquez, P., Vicent, T., & Ferrer, I. (2016). Improving biogas production from microalgae by enzymatic pretreatment. *Bioresource technology*, 199, 347-351.
- Patinvoh, R. J., Osadolor, O. A., Chandolias, K., Horváth, I. S., & Taherzadeh, M. J. (2017). Innovative pretreatment strategies for biogas production. *Bioresource technology*, 224, 13-24.
- Penissi, A. (2018). Enseñanza y Aprendizaje de la Histología Médica: ¿ Presencialidad o Virtualidad? Teaching and learning of medical histology: Presentability or virtuality? *Revista Argentina de Anatomía Clínica*, 10(1), 9-10.
- Pérez Del Toro, Y., Pérez Medina, Y., Fernández Villalón, M., & Fernández Villalón, M. (2018). Algunos aspectos clínicos y epidemiológicos relacionados con las intoxicaciones exógenas en niños y adolescentes Medisan, 22(4), 377-383.
- Ploechl, M., Hilse, A., Heiermann, M., Quinones, T. S., Budde, J., & Prochnow, A. (2010). Application of hydrolytic enzymes for improving biogas feedstock fluidity. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*.
- Quevedo, S. P. T., Guzmán, Z. G. G., Oliva, D. S., Méndez, D. R., & Delgado, N. P. (2018). Experiencias en la implementación de la disciplina Bases Biológicas de la Medicina en el plan de estudio "D". *Revista de Información Científica*, 97(1), 155-165.
- Quintana, J. A. (2017). Caracterización química localizada de pulpas lignocelulósicas mediante técnicas microscópicas y análisis multivariado aplicado a imágenes. Universidad de Concepción,
- Ramnanan, C. J., & Pound, L. D. (2017). Advances in medical education and practice: student perceptions of the flipped classroom. *Advances in medical education and practice*, 8, 63.
- Raper, E., Stephenson, T., Anderson, D., Fisher, R., & Soares, A. (2018). Industrial wastewater treatment through bioaugmentation. *Process Safety and Environmental Protection*.
- Reales, G., Castaño, H., & Zapata, J. E. (2016). Evaluación de Tres Métodos de Pretratamiento Químico sobre la Deslignificación de Tallos de Yuca. *Evaluación de Tres Métod*, 27(3), 11-22.

- Rodriguez, C., Alaswad, A., Benyounis, K., & Olabi, A. (2017). Pretreatment techniques used in biogas production from grass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 68, 1193-1204.
- Rodriguez. (2016). Ppretratamiento de hidrólisis hidrotermica para la degradación de los carbohidratos complejos de residuos de frutas para la obtención de bioetanol., Universidad de Oviedo,
- Romero López, T. d. J., & Vargas Mato, D. (2017). Uso de microorganismos eficientes para tratar aguas contaminadas. *Ingeniería Hidráulica y Ambiental*, 38(3), 88-100.
- Salihu, A., & Alam, M. Z. (2016). Pretreatment methods of organic wastes for biogas production. *J Appl Sci*, 16, 124-137.
- Strang, O., Ács, N., Wirth, R., Maróti, G., Bagi, Z., Rákely, G., & Kovács, K. L. (2017). Bioaugmentation of the thermophilic anaerobic biodegradation of cellulose and corn stover. *Anaerobe*, 46, 104-113.
- Suárez, J., Sosa, R., Martínez, Y., Curbelo, A., Figueroa, T., & Cepero, L. (2018). Evaluation of the biogas production potential in Cuba. *Pastos y Forrajes*, 41(2).
- Subitha, K., Lillykutty, P., Sajith, K. R., Kandamuthan, M., & Usha, P. (2016). Effectiveness of a multimedia resource in histopathology practical teaching in medical undergraduates-a comparative study. *Trop J Path Micro*, 2(3), 168-171.
- Szymanska, M., Chylniska, M., Gdula, K., Kozioł, A., & Zdunek, A. (2017). Isolation and Characterization of Cellulose from Different Fruit and Vegetable Pomaces. *Polymers*, 495(5).
- Tang, B., Coret, A., Qureshi, A., Barron, H., Ayala, A. P., & Law, M. (2018). Online Lectures in Undergraduate Medical Education: Scoping Review. *JMIR medical education*, 4(1).
- Tsapekos, P., Angelidaki, I., Kougiás, P., Cornet, Y., Gudmundsson, H., & Leleur, S. (2017). Enhancing biogas production from recalcitrant lignocellulosic residue. Technical University of Denmark, DTU Environment,
- Tsapekos, P., Kougiás, P., Vasileiou, S., Treu, L., Campanaro, S., Lyberatos, G., & Angelidaki, I. (2017). Bioaugmentation with hydrolytic microbes to improve the anaerobic biodegradability of lignocellulosic agricultural residues. *Bioresource technology*, 234, 350-359.
- Uscanga, R., Montero, G., Palomar, L., Pelayo, L., Torres, R., & Beleño, T. (2015). Determinación de los principales componentes de la biomasa lignocelulósica; celulosa, hemicelulosa y lignina de la paja de trigo para su posterior pretratamiento biológico.
- Van Kuijk, S., Sonnenberg, A., Baars, J., Hendriks, W., & Cone, J. (2015). Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: a review. *Biotechnology advances*, 33(1), 191-202.
- Vargas-Vargas, J., Jimenez-Canizalez, C., Trujillo-Abella, I., Ordoñez-Chavarro, R., & A, Z.-S. (2019). Intoxicaciones agudas por sustancias químicas en Ibagué, Colombia en el año 2014; determinación de factores de riesgo para el evento de hospitalización. . *Rev Univ Ind Santander Salud.*, 51(1), 53-58. doi:10.18273/revsal.v51n1-2019006
- Vargas, A. A. (2017). Producción de biocombustibles y químicos de origen renovable
- Wagner, A., Lackner, N., Mutschlechner, M., Prem, E., Markt, R., & Illmer, P. (2018). Biological Pretreatment Strategies for Second-Generation Lignocellulosic Resources to Enhance Biogas Production. *Energies*, 11(7), 1797.
- Weinrich, S., Schafer, F., & Liebetrau, J. (2018). Method comparison and challenges of substrate and efficiency evaluation of biogas plants.
- Wojcieszak, M., Dziewit, L., & Drewniak, L. (2017). Biostimulation and bioaugmentation of microbial community involved in the biogas production of sewage sludge. *Journal of Biotechnology*, 256, S41-S42.
- Wunna, K., Nakasaki, K., Auresenia, J. L., Abella, L. C., & Gaspillo, P. D. (2017). Effect of Alkali Pretreatment on Removal of Lignin from Sugarcane Bagasse *CHEMICAL ENGINEERING*, 56.
- Yang, Z., Xu, X., Dai, M., Wang, L., Shi, X., & Guo, R. (2018). Combination of bioaugmentation and biostimulation for remediation of paddy soil contaminated with 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *Journal of hazardous materials*, 353, 490-495.
- Yıldırım, E., Ince, O., Aydin, S., & Ince, B. (2017). Improvement of biogas potential of anaerobic digesters using rumen fungi. *Renewable Energy*, 109, 346-353.
- Young, D., Dollhofer, V., Callaghan, T. M., Reitberger, S., Lebuhn, M., & Benz, J. P. (2018). Isolation, identification and characterization of lignocellulolytic aerobic and anaerobic fungi in one-and two-phase biogas plants. *Bioresource technology*, 268, 470-479.
- Yu, S., Zhang, G., Li, J., Zhao, Z., & Kang, X. (2013). Effect of endogenous hydrolytic enzymes pretreatment on the anaerobic digestion of sludge. *Bioresource technology*, 146, 758-761.
- Yunqin, L., Dehan, W., & Lishang, W. (2010). Biological pretreatment enhances biogas production in the anaerobic digestion of pulp and paper sludge. *Waste Management & Research*, 28(9), 800-810.

Zhang, Y., Yu, B., Wang, N., & Li, T. (2018). Acute poisoning in Shenyang, China: a retrospective and descriptive study from 2012 to 2016. *BMJ open*, 8(8), e021881.

Zhu, Z., Rezende, C., Simister, R., MCQueen, S. J., Macquarrie, D. J., KPolikarpov, I., & Gomez, L. D. (2016). Efficient sugar production from sugarcane bagasse by microwave assisted acid and alkali pretreatment. *Biomass and Bioenergy*.

Ziemiński, K., & Kowalska-Wentel, M. (2016). Effect of Different Sugar Beet Pulp Pretreatments on Biogas Production Efficiency. *Appl Biochem Biotechno*. doi:DOI 10.1007/s12010-016-2279-1

Zulyadi, N. H., Saleh, S. H., & Sarjo, S. H. (2016). Fractionation of hemicellulose from rice straw by alkaline extraction and ethanol precipitation. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 20(2), 329 - 334.