



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

“Obtención y caracterización de material lignocelulósico a partir de residuos de *Agave salmiana* y su uso en copolímeros de metacrilato”

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

PRESENTA

M. en C. Rafael Chávez Romero

Directoras de Tesis

Dra. Rosalva Mora Escobedo

Dra. Areli Flores Morales



Ciudad de México, junio 2018



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 10:00 horas del día 19 del mes de diciembre del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de E.N.C.B. para examinar la tesis titulada:

Obtención y Caracterización de un Material Lignocelulósico a partir de Residuos de *Agave salmiana* y su uso en la Copolimerización con Metacrilato

Presentada por el alumno:

CHÁVEZ

Apellido paterno

ROMERO

Apellido materno

RAFAEL

Nombre(s)

Con registro:

A	1	4	0	4	0	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Rosalva Mora Escobedo

Dra. Areli Flores Morales

Dra. Gloria Davila Ortiz

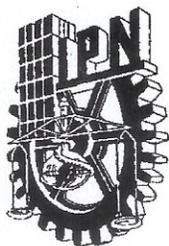
Dra. María Eugenia Jaramillo Flores

Dra. Lidia Dorantes Alvarez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Gerardo Aparicio Ozores





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 15 del mes de Junio del año 2018, el (la) que suscribe M. en C. Rafael Chávez Romero alumno(a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con número de registro A140409, adscrito(a) a la Escuela Nacional de Ciencia Biológicas, manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del (de la, de los) Dra. Rosalva Mora Escobedo y Dra. Areli Flores Morales y cede los derechos del trabajo titulado Obtención y caracterización del material lignocelulósico a partir de residuos de *Agave salmiana* y su uso en copolímeros de metacrilato, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones rosalmorae@gmail.com; favez75@yahoo.com.mx y floresafm@hotmail.com . Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

M. en C. Rafael Chávez Romero
Nombre y firma del alumno(a)

Vo.Bo.

Dra. Rosalva Mora Escobedo
Nombre y firma del director (a)



Universidad Autónoma de Nayarit

Secretaría de Investigación y Posgrado

Revista Bio Ciencias

A QUIEN CORRESPONDA:
PRESENTE.-

Quien suscribe el Dr. Manuel Iván Girón Pérez, Editor de la *Revista Bio Ciencias* (ISSN: 2007-3380) incorporada a los índices: *Web of Science (Thomson Reuters)* DOAJ, IMBIOMED, LATINDEX y Conacyt, hace

CONSTAR

Que el Artículo titulado **"DISINTEGRATION TREATMENTS OF AGAVE SALMIANA WASTE: LIGNOCELLULOSE CHARACTERIZATION BY PHYSICOCHEMICAL, THERMOGRAVIMETRIC AND SPECTROSCOPIC STUDIES"**, de la autoría de *Chávez-Romero Rafael, Flores-Morales Areli, Yee-Madeira Hernani Tiago, García-Zebadúa Julio Cesar, González-Montoya Marcela, Mora-Escobedo Rosalva*. Actualmente se encuentra en calidad de Artículo Aceptado en proceso de edición para su publicación en la Revista Bio Ciencias.

Se extiende la presente a petición de los interesados, para los fines Administrativos que a ellos convengan en la Ciudad de Tepic, Estado de Nayarit México, a los veintiocho días del mes de junio del año dos mil dieciocho.

ATENTAMENTE

DR. MANUEL IVAN GIRON PEREZ
EDITOR DE LA REVISTA BIO CIENCIAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE NAYARIT



SECRETARIA DE
INVESTIGACION Y
POSGRADO

revista
Bio ciencias
ISSN: 2007-3380

- Universidad Autónoma de Nayarit, Tepic Nayarit, México.
- (+52) 311 211 88 00 Ext. 8922
- revistabiociencias@gmail.com
<http://revistabiociencias.uan.edu.mx>

RESUMEN

La generación de residuos ricos en material lignocelulósico, provenientes de la agroindustria, se ha incrementado e industrias como la alimentaria, de empaque, automotriz y de la construcción están interesadas en aprovechar, ya que son una fuente económica y abundante para obtener materiales compuestos reforzados. Por lo tanto, se plantea desintegrar el residuo de agave por tratamientos fisicoquímicos secuenciales para recuperar materiales de diferentes propiedades para diversas aplicaciones, además de evaluar la susceptibilidad de los materiales fibrosos a la reacción química por copolimerización utilizando metilmetacrilato (MMA) como activador para obtener materiales plásticos. Para eso, se recolectaron hojas de *A. salmiana* después de la etapa de producción, se liofilizo y molió a un tamaño de partícula de 180 μm (M0). Se analizó la composición química de M0, y se aplicaron cuatro tratamientos para extraer o eliminar componentes de manera secuencial: 1). Extracción Soxhlet de M0 con éter de petróleo (M1); 2). Extracción acuosa de M1 a 25°C y extracción acuosa a 80 °C, 2 h (M2); 3). Hidrolisis alcalina de M2 con NaOH al 4%, 80°C, 2 h. (M3); y 4). Oxidación de M3 con NaClO₂ al 1.7 %, 80 °C, 4 h., además de oxidación con H₂O₂ al 2%, 90°C, 2 h. (M4). La reacción de copolimerización se realizó con el material lignocelulósico M2, M3 y M4 obtenidos por la extracción fraccionada del residuo de agave, en medio acuoso utilizando nitrato de amonio y cerio IV (CAN) como catalizador y MMA. Los materiales lignocelulósicos y de copolimerización se analizaron para conocer variación de grupos funcionales de los componentes, índice de cristalinidad, estabilidad térmica, autofluorescencia de los componentes, micro y nano estructuras. Además, las imágenes se analizaron por Image J lo que permitió determinar las características morfométricas y fractales.

La composición química del residuo fue: humedad (86.1 %), cenizas (5.1 %), extracto etéreo (0.7 %), azúcares reductores totales directos (26.5 %), proteínas (5.1 %) y fibras (22.1 %). Los rendimientos, en base seca, de las muestras fueron: M1 = 99.3 %, M2 = 52.5 %, M3 = 33.4 % y M4 = 76.4 %. La concentración de la celulosa se enriqueció después aplicar los métodos de extracción descritos anteriormente, alcanzando 80.7 % de celulosa con el último tratamiento. Los productos de copolimerización presentaron físicamente consistencia plástica y aunque el rendimiento es mínimo, hubo señales en el infrarrojo que indican cambios químicos, además la estabilidad térmica y los índices de cristalinidad son diferentes entre las fibras y sus respectivos copolímeros. Cambios en la autofluorescencia y en las micro y nanoestructuras, por medio de análisis de imágenes se observaron cambios morfométricos, pero no de textura. La extracción

acuosa genera el mejor rendimiento, seguido del tratamiento alcalino, alcanzando 53 y 76 % de celulosa, respectivamente. El material copolimerizado con la lignocelulosa obtenida con tratamiento alcalino fue el más estable térmicamente.

ABSTRACT

The generation of waste rich in lignocellulosic material, coming from the agro-industry, has increased and industries such as food, packaging, automotive and construction are interested in taking advantage since they are an economic and abundant source to obtain reinforced composite materials. Therefore, it is proposed to disintegrate the agave residue by sequential physicochemical treatments to recover materials of different properties for diverse applications, besides evaluating the susceptibility of the fibrous materials to the chemical reaction by copolymerization using methylmethacrylate (MMA) as an activator to obtain materials plastics. For that, leaves of *A. salmiana* were collected after the production stage, freeze-dried and ground to a particle size of 180 μm (M0). The chemical composition of M0 was analyzed, and four treatments were applied to extract or eliminate components sequentially: 1). Soxhlet extraction of M0 with petroleum ether (M1); 2). Aqueous extraction of M1 at 25 °C and aqueous extraction at 80 °C, 2 h (M2); 3). Alkaline hydrolysis of M2 with 4% NaOH, 80 °C, 2 h. (M3); and 4). Oxidation of M3 with 1.7% NaClO₂, 80 °C, 4 h., In addition to oxidation with 2% H₂O₂, 90 °C, 2 h. (M4). The copolymerization reaction was carried out with the lignocellulosic material M2, M3 and M4 obtained by the fractional extraction of the agave residue, in an aqueous medium using ammonium nitrate and cerium IV (CAN) as a catalyst and MMA. The lignocellulosic and copolymerization materials were analyzed to know variation of functional groups of the components, crystallinity index, thermal stability, autofluorescence of the components, micro and nanostructures. In addition, the images were analyzed by Image J to determine the morphometric and fractal characteristics. The chemical composition of the residue was: humidity (86.1%), ash (5.1%), ether extract (0.7%), total direct reducing sugars (26.5%), proteins (5.1%) and fibers (22.1%). The yields, on dry basis, of the samples were: M1 = 99.3%, M2 = 52.5%, M3 = 33.4% and M4 = 76.4%. The concentration of cellulose was enriched after applying the extraction methods described above, reaching 80.7% cellulose with the last treatment. The copolymerization products physically presented plastic consistency and although the yield is minimal, there were signals in the infrared indicating chemical changes, in addition, the thermal stability and the crystallinity indexes are different

between the fibers and their respective copolymers. Changes in autofluorescence and in micro and nanostructures, by means of image analysis, morphometric changes were observed but not the texture. The aqueous extraction generates the best yield, followed by the alkaline treatment, reaching 53 and 76% of cellulose, respectively. The material copolymerized with lignocellulose obtained with alkaline treatment was the most thermally stable.

Índice general

RESUMEN	5
ABSTRACT	6, 7
Índice de figuras	10
Índice de cuadros	12
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1 Residuos de agave pulquero y su composición	14
1.2 Características y propiedades de las biofibras vegetales	17
1.2.1 Hemicelulosas	17
1.2.2 Celulosa	18
1.2.3 Lignina	21
1.3.1 Métodos mecánicos (físicos)	23
1.3.2 Métodos químicos	23
1.3.3 Métodos fisicoquímicos	24
1.3.4 Métodos biológicos (enzimáticos)	24
1.4 Métodos de modificación superficial	25
1.4.1 Tratamiento alcalino	25
1.4.2 Acetilación, EDTA y silano	25
1.4.3 Oxidación clorito y peróxido de hidrógeno	26
1.5 Propiedades del polimetilmetacrilato	27
2. JUSTIFICACIÓN	28
3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo general	31
4.2 Objetivos específicos	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1 Materiales y reactivos	32
5.2 Desintegración fisicoquímica de <i>A. salmiana</i>	33
5.3 Análisis proximal de M0 y fibras en lignocelulosas	34
5.4 Reacción de copolimerización	34
5.5 Análisis instrumental de lignocelulosas y copolímeros	35
5.5.1. Espectroscopia IR-TF	35
5.5.2. Difracción de Rayos X (DRX)	35
5.5.3. Análisis termo gravimétrico (TGA)	36
5.5.4 Colorimetría	36
5.5.5 Microscopia confocal	37
5.5.6 Microscopia electrónica de barrido de alta resolución (MEB-AR)	37
5.6 Análisis de imágenes	37
5.7 Análisis estadístico	38

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1 Caracterización fisicoquímica de lignocelulosas	39
6.2 Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina	40
6.3 Caracterización estructural de lignocelulosa	42
6.3.1 Identificando enlaces químicos por IR-TF	42
6.3.2 Difractogramas e índices de cristalinidad	44
6.3.3 Termogramas y estabilidad térmica	47
6.3.4 Parámetros, cambios, índices, intensidad y ángulo de color de las lignocelulosas	49
6.4 Caracterización microestructural de las lignocelulosas	53
6.5 Análisis de imagen de autofluorescencia de los materiales lignocelulosico	57
6.5.1 Área total de fluorescencias	58
6.5.2 Perímetro de partículas	59
6.5.3 Circularidad de partículas	61
6.5.4 Diámetro de Feret	61
6.5.5 Relación de aspecto AR	63
6.5.6 Dimensión fractal	64
6.5.7 Lagunaridad (área)	65
6.5.8 Textura (Dimensión fractal y lagunaridad)	66
6.6 Síntesis y análisis de copolímeros	66
6.6.1 Porcentaje de injerto	66
6.6.2 Termogravimetría	67
6.6.3 Microscopia confocal de copolímeros	68
6.6.4 Microscopia MEB-AR	70
7. CONCLUSIONES	71
Nomenclatura	72
Bibliografía	73

Índice de figuras

	Pág.
Fig. 1 Principales entidades federativas productoras de aguamiel en México.....	11
Fig. 2 Ciclo del agave pulquero y generación de residuos.....	12
Fig. 3 Estructura de la biofibra e interacciones entre ellas.....	13
Fig. 4 Estructura química de hemicelulosa tipo xilano y glucomanano.....	14
Fig. 5 Jerarquización de la celulosa.....	15
Fig. 6 Polimorfismos de la celulosa.....	16
Fig. 7 Estructura básica de la lignina.....	18
Fig. 8 Espectro IRTF de lignocelulosa de <i>A. salmiana</i> , en pastilla de KBr.....	36
Fig. 9 Difractogramas de lignocelulosas de <i>A. salmiana</i> , técnica de polvos.....	38
Fig. 10 Estabilidad térmica de la lignocelulosa de <i>A. salmiana</i>	41
Fig. 11 Micrografía MEB-AR (1000X) que muestra cambios estructurales para lignocelulosas.....	46
Fig. 12 Micrografía confocal (20X) que muestra cambios de autofluorescencia para lignocelulosas.....	47
Fig. 13 Espectros de emisión de fluorescencia azul (A), verde (B) y roja (C).....	49
Fig. 14 Área de partículas de fluorescencia azul (A), verde (B) y roja (C).....	50
Fig. 15 Perímetro de partículas de fluorescencia azul (A), verde (B) y roja (C).....	52
Fig. 16 Circularidad de las partículas de fluorescencia azul (A), verde (B) y roja (C)..	53
Fig. 17 Diámetro de Feret de las partículas de fluorescencia azul (A), verde (B) y roja (C).....	54
Fig. 18 Relación de aspecto de las partículas de fluorescencia azul (A), verde (B) y roja (C).....	55
Fig. 19 Dimensión fractal (DF_{BCFA}) de las partículas de fluorescencia azul (A), verde (B) y roja (C).....	56
Fig. 20 Lagunaridad de área (λ_{BC}) de las partículas de fluorescencia azul (A), verde (B) y roja (C).....	57
Fig. 21 (A) Dimensión fractal de textura (DF_{SBLA}) y (B) lagunaridad de textura (λ_{SBLA}) de las lignocelulosas sin tratamiento (M0) y por la aplicación de diferentes tratamientos (M1, M2, M3, M4).....	58
Fig. 22 Estabilidad térmica de los copolímeros usando lignocelulosa proveniente de <i>A. salmiana</i>	59

Fig. 23 Microscopia confocal (20X) de los materiales lignocelulosicos (M2, M3 y M4) y material copolimerizado correspondiente (MSA, MCA y MBL).....	61
Fig. 24. Micrografía MEB-AR del copolímero MCA (usando lignocelulosa M3)....	62

Índice de cuadros

	Pág.
Cuadro 1. Composición química de hojas de <i>A. salmiana</i> (M0).....	34
Cuadro 2. Cambios en el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en residuo de <i>A. salmiana</i>	35
Cuadro 3. Rendimientos de material lignocelulósico con diferentes tratamientos.....	36
Cuadro 4. Índices de cristalinidad estimados con el método de Segal (Kaushik et al. 2010).....	40
Cuadro 5. Parámetros de color de acuerdo al modelo cromático CIEL*a*b* de pencas de <i>A. salmiana</i> tratadas.....	44
Cuadro 6. Índices, intensidad, ángulo y cambios de color de pencas de <i>A. salmiana</i> tratadas.....	45
Cuadro 7. Porcentaje de injerto en los copolímeros.....	59

1. INTRODUCCIÓN

Los residuos lignocelulósicos han estado tomando importancia toda vez que son fuente de algunos productos alimenticios, nuevos materiales y químicos que pueden sustituir algunos derivados del petróleo. Además, la falta de disponibilidad de los recursos fósiles en el futuro, así como la contaminación del ambiente que ha generado el uso del petróleo y sus derivados han conducido a investigaciones sobre el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica utilizando procesos de bajo impacto al ambiente.

Después de producir aguamiel, el agave pulquero genera residuos: pencas y tronco. Los cuales no se aprovechan por completo; se secan para usarse como material de combustión o como biomasa para enriquecer la tierra de cultivo, pero podría obtenerse mayor beneficio si se separa y extraen los diferentes componentes que la constituyen, por ejemplo: los carbohidratos libres, pectinas, lípidos, proteínas y la celulosa, hemicelulosa y lignina.

La celulosa es de interés prioritario, ya que puede emplearse de diversas maneras: incorporarla en materiales compuestos para mejorar las propiedades mecánicas (Milsamy 2011), base para sintetizar copolímeros (Lin Chun-xian, 2009), fuente de bioetanol (Cardona 2010), entre otras. Este material, también denominado lignocelulosa, es obtenido por procesos de extracción ácida o alcalina, hasta lograr la mayor purificación con el objetivo de que sea material de reacciones de esterificación o copolimerización para la obtención de plásticos biodegradables de interés en la industria de alimentos y otras. La importancia de los procesos de extracción de componentes lignocelulósicos radica en el impacto que presentan al medio ambiente, el costo del proceso y su aplicación industrial.

Por lo tanto, en este trabajo se planteó determinar el efecto sobre el residuo de pencas de agave pulquero, al aplicar una serie de tratamientos simples de extracción con la finalidad de obtener la mayor proporción de celulosa para hacerla reaccionar con metacrilato de metilo y obtener un copolímero. Por otra parte, en la literatura se reporta generalmente sobre la caracterización de las fibras con relación a las propiedades físicas, como es la descripción de color, tamaño, textura, adsorción o penetración de agua, a través de micrografías, actualmente bajo nuevas tecnologías se puede profundizar midiendo el color con base en algún modelo cromático que permite evaluar cambios asociados a los procesos de extracción de componentes lignocelulósicos.

1.1 Residuos de agave pulquero y su composición

El género agave tiene 210 especies y México cuenta con 159 de las cuales 119 son endémicas (Bartra et al. 2012). El *A. fourcroydes* (henequén) se cultiva en Yucatán para la producción de diferentes productos domésticos; El *A. sisilana* (sisal) se cultiva principalmente en Brasil, del cual provienen materiales fibrosos. El *A. tequilana* se cultiva en Jalisco principalmente para producir tequila. El *A. angustifolia* se produce en Oaxaca para elaborar mezcal.

Como agave pulquero existen diferentes especies, entre ellas están: *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck, (maguey de pulque); *A. mapisaga*; *A. atrovirens* Karw (maguey manso); *A. lehmannii* (maguey corriente); *A. cochlearis* (maguey chalqueño); *A. attisima jacobi* (maguey de venado) (Flores Morales et al. 2009). Algunos autores consideran al *A. americana* como especie pulquera (José & García 2000) y hay algunas especies de *A. salmiana* que se consideran mezcaleros. Aunque el principal enfoque de cultivar agave pulquero es la recuperación de aguamiel para producir pulque, esta planta se ha revalorado recientemente, debido a que estudios recientes mencionan que el aguamiel contiene diferentes fructooligosacáridos de interés alimentario, como la inulina (Apolinário et al. 2014), lo cual está generando una nueva línea de edulcorantes naturales y ubican al aguamiel como una fuente de alimento funcional.

Por otro lado, el *A. americana* se ha estudiado como fuente de fibras textiles (Msahli et al. 2006); Estudios de *A. salmiana* y *A. americana* han reportado el uso de sus fibras como absorbente de metales catiónicos como Cd (II), Pb (II) y Zn (II) en agua (Velazquez-Jimenez et al. 2013; Hamissa et al. 2010). Otros estudios reportan que *A. tequilana* se utiliza en la elaboración de papel artesanal y biocombustibles (Idarraga et al. 1999; Peng et al. 2012). Amar Singh Singha & Rana 2010, reportan la modificación química de *A. americana* para formar materiales compuestos.

La industria del agave pulquero reporta para el año 2008, plantaciones de 195,600 Toneladas de plantas en el estado de Hidalgo, primer lugar en este ramo. Los estados de Tlaxcala, México y Puebla son las entidades más importantes en la producción de pulque (Fig. 1) (Bartra et al. 2012; José & García 2000) (Sagarpa, 2009).

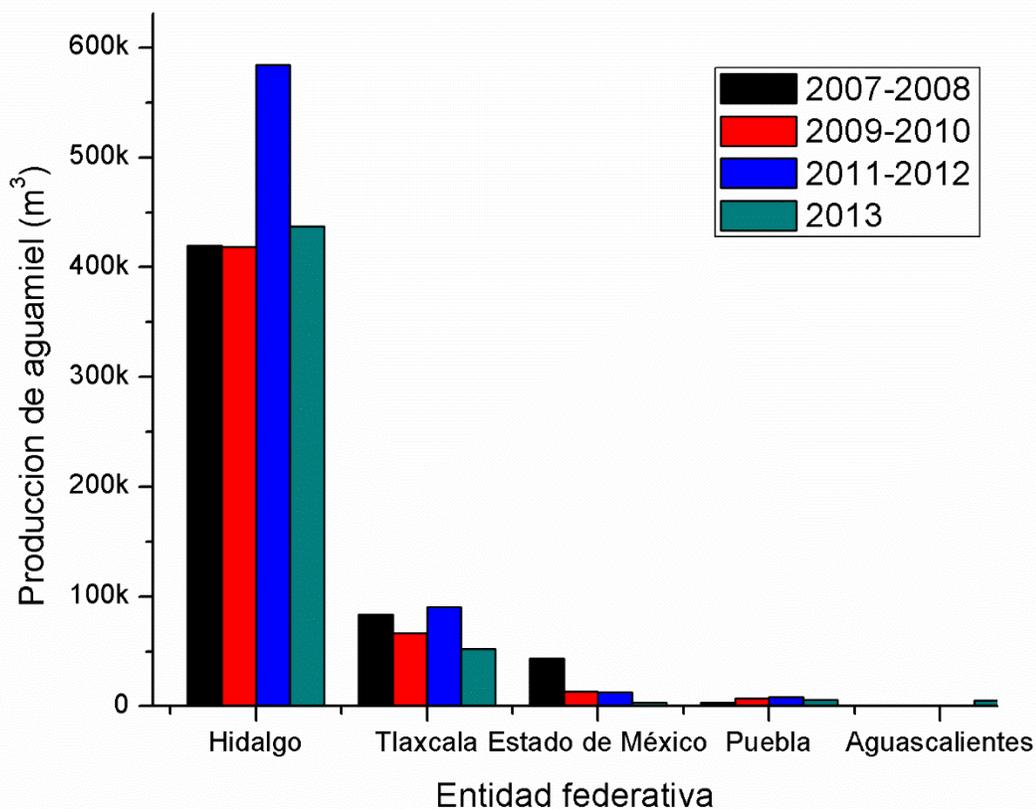


Fig. 1 Principales entidades federativas productoras de aguamiel en México. SIAP, 2016.

En el 2013, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación presentó el proyecto: Tecnologías de Producción, Transformación y Comercialización de Agave Pulquero para los estados de Puebla, Hidalgo y Tlaxcala con el cual se pretendía impulsar la propagación de magueyes y concentración de aguamiel para obtener un jarabe de fructosa de interés comercial (SAGARPA 2013).

La planta de maguey muere al término de su etapa productiva, generando una gran cantidad de residuo. Generalmente, éste se seca en el campo, se biodegrada naturalmente y es aprovechado como abono orgánico, o bien, es utilizado como material de combustión por los habitantes de las poblaciones aledañas al cultivo de maguey.

Por otra parte, Pinos-Rodríguez et al. (2008), describe La composición de las hojas de *A. salmiana* de diferentes edades (12, 14 y 16 años) con un contenido de: 87 – 89.5 % de humedad; y 86.2 – 91.6 % de materia orgánica; 8.4 – 13.8 % de cenizas. De la materia orgánica, 18.9 – 35.8 % azúcares; 3.8 - 4.8 % proteína cruda; y 18.9 - 27 % fue fibra neutra cruda (base seca), con ello

muestra que esta composición no cambia con respecto a las diferentes edades de la planta, excepto para los azúcares que alcanzan su concentración más alta en agaves de 14 años. Por otra parte, se ha reportado que la fibra neutra cruda de hojas de *A. americana* está compuesta por 68.4 % de celulosa; 15.7 % de hemicelulosa y 4.9 % de lignina todo en base seca (Mylsamy & Rajendran 2011). Esta composición es de la fibra macerada en agua por 2 semanas, secadas a temperatura ambiente y cepilladas para eliminar materia adherida a la fibra. Otras hojas de agaves que se han estudiado y que son importantes por sus biofibras son: *A. cantala*; *A. fourcroydes*; y *A. sisilana* (John & Thomas 2008). A la fecha actual no se hay reportes sobre la composición del desecho de maguey pulquero. La Fig. 2 muestra el ciclo del agave pulquero y como se generan los residuos de esta planta.



Fig. 2 Ciclo del agave pulquero y generación de residuos.

1.2 Características y propiedades de las biofibras vegetales

Entre otros componentes, los vegetales contienen tres biopolímeros que en conjunto se conocen como fibra neutra cruda o fibra detergente neutra (FDN) y está formada por: celulosa, hemicelulosa y lignina (John & Thomas 2008). Éstas forman parte de la estructura celular de la biomasa (Fig. 3). La celulosa se encuentra estrechamente asociada a la hemicelulosa y lignina, juntos se conocen como biomasa lignocelulósica y se considera que es un bionanocomposito natural (Habibi et al. 2010). Esta naturaleza de las biofibras complica la separación de cada una. Por lo que para explotar al máximo sus propiedades se deben separar. El aislamiento de cada biopolímero de la biomasa se realiza disolviendo, alterando y/o destruyendo la estructura de los otros dos.

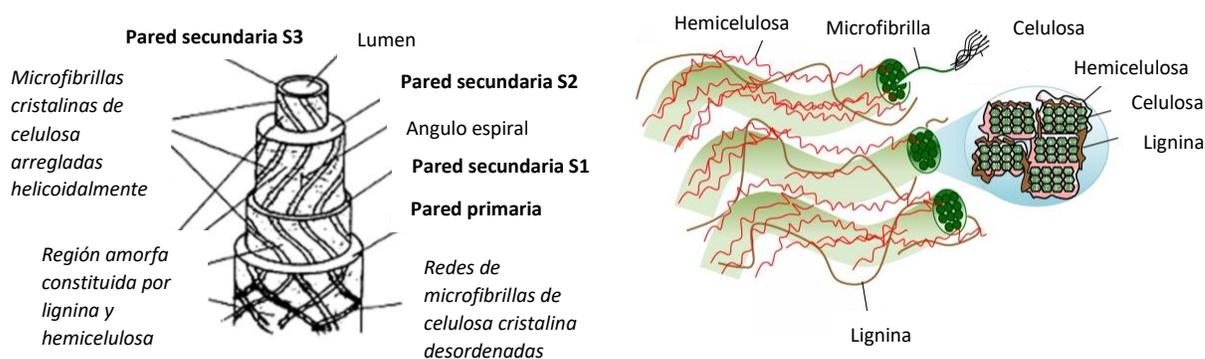


Fig. 3 Estructura de la biofibra e interacciones entre ellas (John & Thomas 2008).

1.2.1 Hemicelulosas

Son un conjunto de polisacáridos heterogéneos y ramificados, compuestos de una combinación de azúcares de 5 y 6 carbonos: xilosa, arabinosa, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, ácido glucurónico y ácido galacturónico (Fig. 4). Tienen bajo peso molecular y un grado de polimerización de 80-200 unidades. La heterogeneidad de azúcares, ramificación del polímero y grado de polimerización son diferencias marcadas entre celulosa y hemicelulosa (John & Thomas 2008; Peng et al. 2012). Además de estar asociados a la celulosa y lignina, también se asocian con proteínas de la pared celular y otros compuestos fenólicos por enlaces de hidrógeno y covalentes y por interacciones iónicas e hidrofóbicas (Sun et al. 2000). Por otra parte, los métodos de aislamiento de la hemicelulosa incluyen: extracción alcalina, extracción con peróxido alcalino, extracción con agua caliente y explosión con vapor (Peng et al. 2012). La hemicelulosa es hidrofílica, soluble en álcalis y fácilmente hidrolizada en ácidos (John & Thomas 2008). Los azúcares, producto de su hidrólisis, se pueden transformar en etanol o en 5-hidroximetilfural, furfural, ácido levulínico, y

xilitol. También se pueden convertir en biopolímeros por modificación, usándose como modificadores de viscosidad, aditivos de resistencia a la humedad en papel y aglutinante de tabletas; posibles usos médicos como protector de úlceras, antitúxico, inmunoestimulante y antitumoral (Peng et al. 2012).

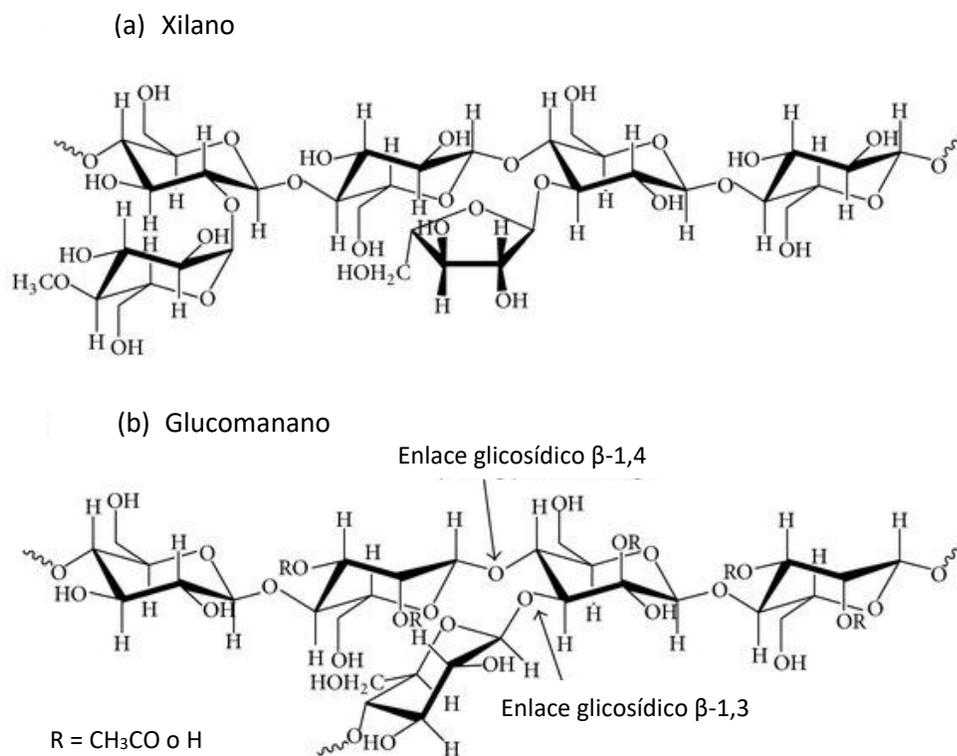


Fig. 4 Estructura química de hemicelulosa tipo xilano y glucomanano

1.2.2 Celulosa

Es un homopolisacárido lineal cuya unidad básica es β -D-Glucopiranososa unida por enlaces β -1-4, la unidad que se repite es un dímero de la glucosa (celobiosa). Cada monómero contiene tres grupos hidroxilos, susceptibles de formar puentes de hidrógeno y que influyen en el empaquetamiento cristalino y propiedades físicas de la celulosa. En la madera su grado de polimerización es de alrededor de 10,000 ((Habibi et al. 2010; John & Thomas 2008). Su jerarquía morfológica (Fig. 5), de menor a mayor tamaño, consiste en:

1. Molécula de celulosa

2. Protofibrilla (Fibrilla elemental, 5 nm). Una protofibrilla se forma por 36 moléculas de celulosa.
3. Microfibrilla (CMF y/o CNC, 20 – 50 nm).
4. Grupo de microfibrillas.

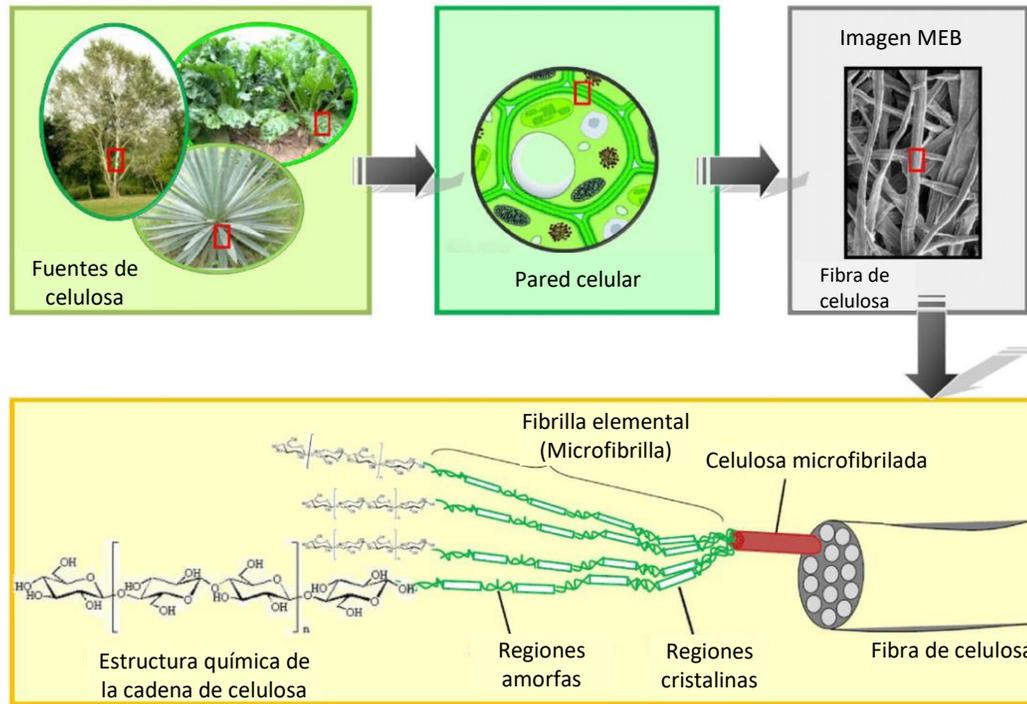


Fig. 5. Jerarquización de la celulosa (Lavoine et al. 2012)

De acuerdo al nivel de arreglo de las microfibrillas hay regiones cristalinas (altamente ordenadas, celulosa nanocristalina, CNC) o amorfa (desordenadas) (Lavoine et al. 2012; Habibi et al. 2010). En la región cristalina, las interacciones inter e intramoleculares pueden generar polimorfos de celulosa. Se han identificado seis polimorfos intercambiables llamados I, II, III_I, III_{II}, IV_I y IV_{II}.

La celulosa I, nativa en muchas fuentes, agrupa sus cadenas paralelamente; existe en dos sub-alomorfos: Celulosa I α (con celda unitaria triclinica) prevalece en algas y bacterias; mientras que celulosa I β (con celda unitaria monoclinica) se encuentra en plantas superiores. La celulosa II agrupa sus cadenas de forma antiparalela y tiene una fase monoclinica. Ésta se obtiene por regeneración, que consiste en disolver la celulosa I con soluciones complejas de grupo amino y un metal pesado, y luego precipitando la celulosa con agua. También por mercerizado se obtiene

celulosa II, el procedimiento radica en remojar con solución de hidróxido de sodio (> 17 %) o ácido nítrico (65 %) celulosa I y posteriormente eliminar esta solución.

Si la celulosa I o II se ponen en contacto con amoníaco o aminas, se forma la celulosa III que puede ser III_I o III_{II} dependiendo del tipo de celulosa expuesta. Ambas tienen casi la misma estructura monoclinica. Por otro lado, el polimorfo IV_I y IV_{II} se prepara calentando a 260 °C en glicerol la celulosa III_I o III_{II}, no se tiene claro el tipo de estructura cristalina que tienen (Habibi et al. 2010). La Fig. 6 muestra las condiciones para obtener los diferentes polimorfos de la celulosa y la relación entre ellos.

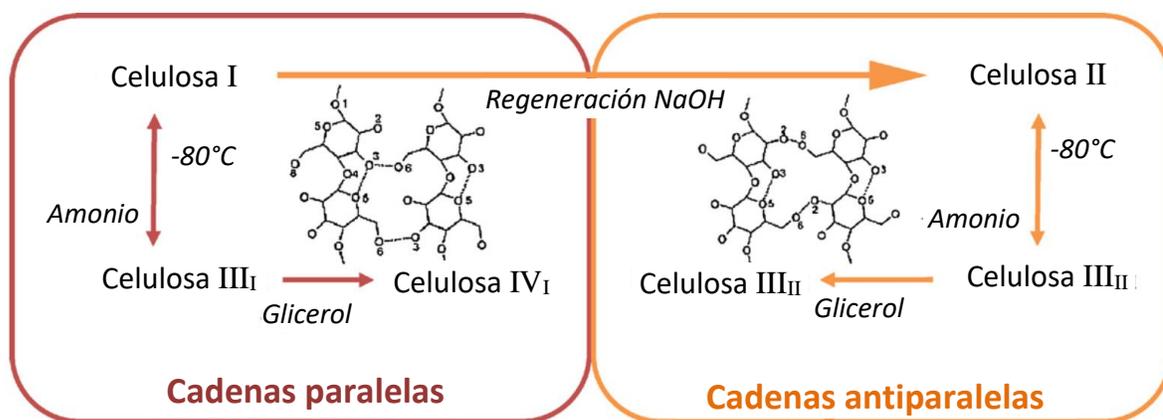


Fig. 6 Polimorfismos de la celulosa.

La celulosa es altamente resistente a álcali fuerte y moderadamente a agentes oxidantes, pero es fácilmente hidrolizable por ácidos a azúcares solubles en agua (John & Thomas 2008).

La celulosa es considerada como la biofibra de mayor interés para la formación de materiales compuestos. Las pulpas blanqueadas Kraft y al sulfito obtenidas de la madera son los materiales más comunes para la fabricación de celulosa microfibrilada (CMF). La CMF se extrae por medios físicos manejando un homogenizador de Gaulin, un microfluidizador o un molino, todos ellos conllevan un alto consumo de energía. Además, debido a que la celulosa en la madera se encuentra en una pared secundaria de la planta, obtener CMF demanda mayor consumo de energía. Por otro lado, la CMF a partir de los residuos de las cosechas agrícolas y sus subproductos se obtiene desde una pared primaria: se consume menos energía y hay beneficios ambientales, y es una fuente fácilmente renovable (Lavoine et al. 2012).

Las microfibrillas, largas y flexibles, tiene alrededor de 20 nm de ancho, y de 10 – 50 µm en longitud, consisten de dominios amorfos y cristalinos alternados (Brinchi et al. 2013), como se aprecia en la Fig. 5. La CMF se puede convertir en películas, recubrir otros materiales o mezclarse con una matriz polimérica (Lavoine et al. 2012). Al combinarse con otros biopolímeros como el almidón o con polímeros sintéticos como el polietileno, se obtiene materiales con propiedades mecánicas, ópticas y/o térmicas mejoradas.

La celulosa nanocristalina (CNC) se obtiene de CMF por medio de una hidrólisis con un ácido fuerte al 60 %. Este tipo de celulosa está formada por partículas en forma de varilla rígida de 5 – 70 nm de ancho y 100 nm a varias micras de largo. Las partículas son 100 % de celulosa y altamente cristalina entre 54 y 88 % (Moon et al. 2011). Las dimensiones, morfología y grado de cristalinidad varían dependiendo de la fuente de material celulósico y de las condiciones de preparación (Habibi et al. 2010). La obtención de celulosa por medios químicos, hidrólisis ácidas o alcalinas, generan bajos rendimientos de recuperación (Khalil et al. 2012).

1.2.3 Lignina

La Fig. 7 muestra la estructura básica de la lignina, la cual es un polímero hidrocarbonado complejo, con constituyentes alifáticos y aromáticos, que proporciona rigidez a las plantas y ofrece protección contra patógenos y herbívoros. Es totalmente amorfa y de naturaleza hidrofóbica, se considera que es un polímero termoplástico (Stephens & Halpin 2007).

Es totalmente insoluble en la mayoría de los disolventes y no se puede dividir en unidades monoméricas. Sus unidades estructurales derivan del 4-hidroxi-3-metoxifenilpropano. Contiene 5 hidroxilos y 5 metóxidos por unidad de construcción. Se considera que la lignina es el componente químico más difícil de retirar de la biomasa lignocelulósica (Brinchi et al. 2013). No se hidroliza con ácidos, pero es soluble en álcali caliente, fácilmente oxidado y condensable con fenol. No se ha establecido ningún método que sea capaz de aislar la lignina en su estado natural.

Sin embargo, la extracción de lignina altamente pura es fácil de realizar por hidrólisis ácida y el principal uso que se ha encontrado es para la elaboración de fibra de carbono (Luo et al. 2011). Es importante evaluar el contenido de lignina para optimizar los parámetros de los pre-tratamientos mecánicos y químicos necesarios para producir pulpa de celulosa pura (Brinchi et al. 2013).

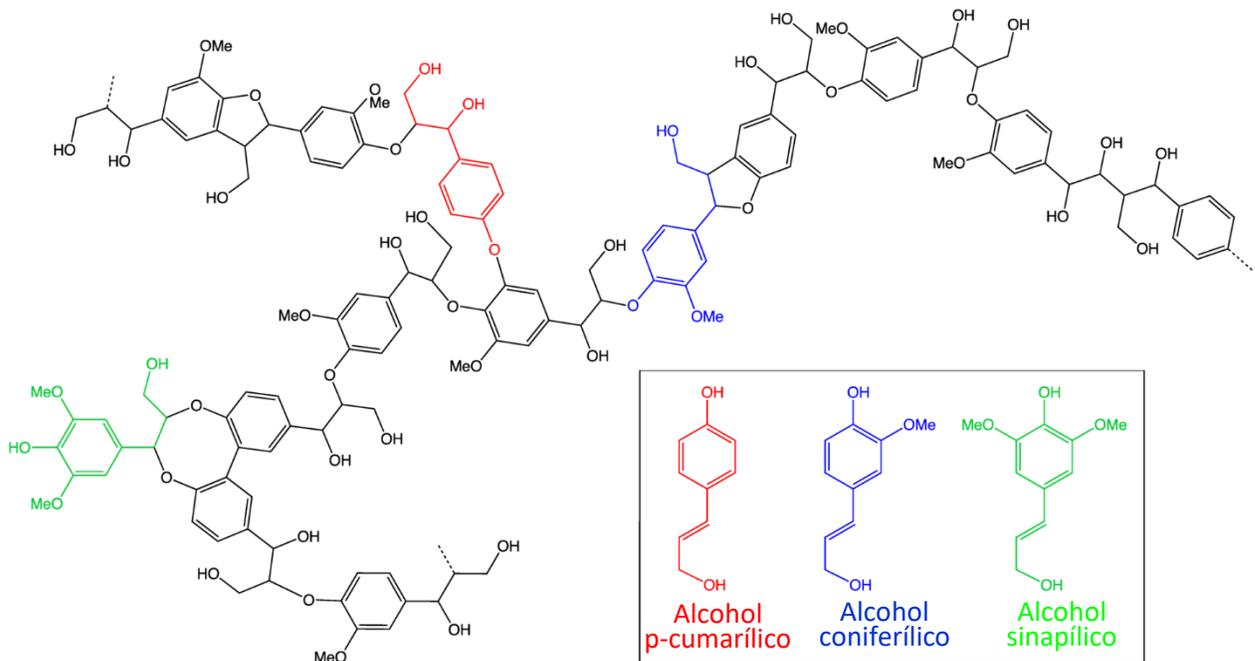


Fig. 7 Estructura básica de la lignina

1.3 Obtención de lignocelulosas

La lignocelulosa está compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina, junto con pequeñas cantidades de proteínas, aceites y cenizas. Su aprovechamiento podría derivar en la obtención de más de 200 compuestos de valor agregado al aplicar diversos métodos de tratamiento. Además, podría ser la base para sustituir al petróleo como fuente de productos químicos para la obtención de productos muy diversos como son biocombustibles, biomateriales y biomoléculas (Isikgor y Becer 2015).

La composición y conformación de la lignocelulosa la hace resistente a la degradación química y enzimática. Por ello, es necesario aplicar un pretratamiento, o una combinación de ellos, para modificar sus propiedades físicas y químicas a través de fraccionar, solubilizar, hidrolizar y separar sus componentes. La finalidad común que tienen es reducir el tamaño de la biomasa y abrir su estructura física (Isikgor y Becer 2015). Estos pretratamientos se han clasificado en: mecánicos (físicos), químicos, fisicoquímicos y biológicos (enzimáticos).

1.3.1 Métodos mecánicos (físicos)

La molienda y ultrasonido son comunes para reducir el tamaño de las partículas e incrementar la relación superficie/volumen para mejorar el contacto entre la biomasa y los reactivos de tratamientos posteriores. La molienda consiste en desgarrar a la biomasa con una superficie rugosa. La pulpa refinada se obtiene alimentando la biomasa al centro rotatorio del disco en presencia de un aspersor de agua. Se utilizan aparatos mecánicos como el homogenizador de Gaulin, microfluidizador de pulpa, molino de piedra, licuadora o triturador para someter la suspensión o pulpa de la fibra a esfuerzos mecánicos extremos y ocasionar la liberación de las microfibrillas rompiendo la pared celular (Lavoine et al. 2012; Uetani & Yano 2011; Bhatnagar & Sain 2005). Con este tratamiento se obtiene CMF. Los molinos de bolas ejercen una fuerza grande sobre la fibra de tal manera que se convierte la celulosa cristalina en celulosa amorfa.

1.3.2 Métodos químicos

Se aplican reactivos que rompen los enlaces de los componentes para lograr su separación. La principal estrategia que se sigue para aislar las fibras por medios químicos es separando la lignina de la matriz. En la madera se usan principalmente dos procesos para obtener: Proceso de sulfato (Kraft) y proceso de sulfito. Sin embargo, como no hay un reactivo que sea selectivo para la lignina, existe pérdida de carbohidratos (celulosa y hemicelulosa) en el proceso. Además, se contamina el agua con especies azufradas.

Para materiales provenientes de plantas, se utilizan normalmente el remojo con agua destilada para retirar los azúcares solubles (Praznik et al., 2013; Mylsamy et al., 2011). También es frecuente realizar una extracción soxhlet con acetona para eliminar grasas y lignina (Amar Singh Singha & Rana 2010). También se incluyen comúnmente procesos de hidrólisis: la alcalina es común aplicar tratamientos con NaOH en concentraciones alrededor de 4 a 5 % para eliminar hemicelulosa, lignina y azúcares. También se han utilizado $\text{Ca}(\text{OH})_2$,

La hidrólisis ácida se produce con H_2SO_4 , H_3PO_4 y HCl diluido o concentrado para recuperar lignina.

La extracción con disolventes orgánicos como etanol, acetona, etc., disuelve por calentamiento diferentes componentes. Eso permite la eliminación de componentes de la biomasa de tal manera

que se pueden recuperar con ligeras alteraciones comparados a tratamientos con ácidos o álcalis fuertes. Es un método que se aplica en un sentido ecológico porque evita descargas al agua.

La oxidación TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) incorpora grupos carboxilato y genera fuerzas de repulsión entre moléculas de celulosa produciendo fibras menos rígidas y cohesivas.

Existen otros métodos de extracción de material lignocelulósico como son la hidrólisis ácida y la ultrasonificación de alta intensidad.

1.3.3 Métodos fisicoquímicos

La termo hidrólisis o fraccionamiento acuoso utiliza agua a alta temperatura y presión

La auto hidrólisis o explosión con vapor consiste en someter biomasa con vapor en alta presión de vapor por periodos cortos de tiempo seguido por una descompresión repentina (explosión) para lograr la fibrilación o “mulching” por acción química y mecánica. Se introdujo inicialmente para desfibrilar madera. Los efectos de este proceso en la biomasa según (Singh et al. 2015; Kaushik et al. 2010) son:

- Rompimiento de los enlaces glicosídicos.

- Rompimiento de los enlaces β -éter de la lignina.

- Rompimiento de los enlaces complejos lignina-carbohidrato.

- Modificación química menor de la lignina y carbohidratos

1.3.4 Métodos biológicos (enzimáticos)

Aplicar tratamiento enzimático como la pectinasa (*aspergillus aculleatus*) para retirar la pectina en *A. americana* (Bessadok et al. 2008). Para obtener fibras que sean menos rígidas y cohesivas, se consigue con enzimas como la endogluconasa tipo C.

1.4 Métodos de modificación superficial

Las fibras naturales tienen carácter hidrofílico y muchas matrices poliméricas tienen carácter hidrofóbico, para que haya buena adhesión se debe modificar la fibra por reacciones de los hidroxilos de la celulosa con reactivos como: silanos, halogenuros de acilo, isocianatos, ácidos carboxílicos o anhídridos (John & Thomas 2008). Estas modificaciones reducen el envejecimiento prematuro por degradación y pérdida de fuerza (Bessadok et al. 2008). La modificación química se puede hacer por tres formas (Xie et al. 2010):

1. Injertando polímeros en la fibra. Monómeros vinílicos.
2. Reticulación de las paredes celulares de la fibra, toluen diisocianato para reticular celulosa
3. Usando agentes acoplantes. Anhídrido maleico para polipropileno y polietileno; Isocianatos para uretanos.

Sin embargo, este tratamiento no es necesario cuando la matriz es polar como un poliéster insaturado o una resina epóxica.

1.4.1 Tratamiento alcalino

Es un tratamiento que inicialmente se hizo para mejorar la reactividad de colorantes con las fibras. Varios estudios han aplicado este tratamiento a fibras de agave (*A. fourcroydes*, *A. sisilana* y *A. americana*) encontrando que se degradan significativamente los componentes de la pared interna dejando intacta la pared celular; incrementa la separación fibrilar y la pérdida de celulosa amorfa (Schalek et al. 2005). Separa impurezas, expone a la lignina hidrofóbica e incrementa el área superficial (Thamae & Baillie 2007). Se incrementa el módulo de Young y reduce tanto el contenido de hemicelulosa como de lignina (Kim & Netravali 2010). Al hidrolizar con hidróxido de sodio al 5 % hojas de *A. americana* por 30 min, se modifica la superficie de la fibra y se mejoran los enlaces químicos para resistir altas cargas de tensión en los composites epóxico/fibra (Mylsamy & Rajendran 2011).

1.4.2 Acetilación, EDTA y silano

La acetilación es otro tratamiento económico de las fibras que genera hidrofobicidad para mejorar la adhesión a matrices de materiales compuestos. (Khalil et al. 2001), realizaron la acetilación de

fibras de coco con anhídrido acético y notaron que se incrementó la resistencia a la cizalladura interfacial, además de que cambia la morfología superficial de la fibra que llegó a ser mucho más suave. La mejor adhesión y propiedades mecánicas fueron mostradas con poliestireno.

El EDTA es usado para debilitar la estructura de gel formado por pectina y iones calcio y para separar la pectina (pectina altamente metilesterificada). Le Troedec et al. (2008), usaron este tratamiento, solo y posterior al tratamiento con álcali, como un agente quelante para evitar la fijación de iones calcio en la superficie de la fibra de cáñamo. Se mejoró el grado de cristalinidad, pero no tanto como el tratamiento con álcali y la fuerza de adhesión fue menor que en la fibra sin ningún tratamiento, posiblemente al menor contacto entre los coloides y las fibras y a la heterogeneidad de la superficie.

(Thamae & Baillie 2007), sometieron *A. americana* a un tratamiento con una solución al 0.05 % (p/p) de trietoxivinilsilano con agitación por 5 min posterior a un mercerado pero no se apreció ninguna mejora de propiedades mecánicas ni de enlace interfacial de la fibra con polietileno de alta densidad (HDPE) usado.

1.4.3 Oxidación: clorito y peróxido de hidrógeno

Aunque existen métodos ecológicos como el peróxido de hidrógeno, ozono, entre otros para el blanqueamiento de pulpa. Sigue siendo utilizado el cloro por su efectividad en el blanqueo y precio económico, genera un impacto negativo ecológicamente.

Oxidación con clorito, peróxido de hidrogeno

1.5 Propiedades del polimetilmetacrilato.

El metil metacrilato es un líquido incoloro, con olor parecido al azufre, dulce, penetrante, tono hedónico: desagradable. Ligeramente soluble en agua, soluble en tetrahidrofurano, esteres e hidrocarburos clorados y aromáticos. Se polimeriza por medio de radicales libres en masa o en suspensión, como se muestra en la reacción de la Fig. 8. Los objetos se moldean por inyección o soplado, extrusión, termoformado y vaciado. Este monómero por si solo produce el polimetilmetacrilato, el cual tiene alta resistencia mecánica, excelentes propiedades ópticas y térmicas:

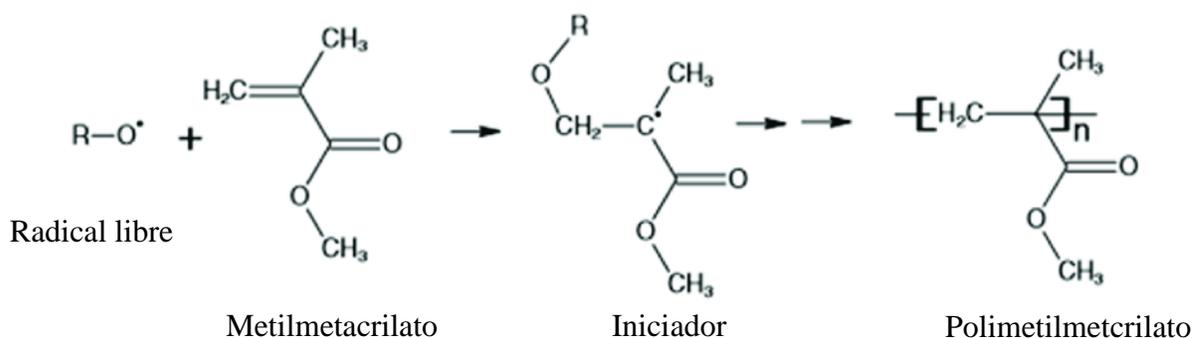


Fig. 8 Reacción de copolimerización del metilmetacrilato por medio de radicales libres.

El polimetilmetacrilato es un polímero sintético termoplástico lineal que tiene una alta claridad óptica (80-93 % de la luz visible). Tiene aplicaciones médicas, farmacéuticas (empacado “no ingerible” de capsulas, tabletas, píldoras, supositorios), ingeniería eléctrica, vehículos, equipo de oficina, juguetes y en la construcción (REF). Sin embargo, sus propiedades mecánicas limitan sus usos en muchas áreas (Maiti 2013). Este polímero no se afecta por soluciones acuosas de detergentes, limpiadores, ácidos y álcalis diluidos e hidrocarburos alifáticos. Es atacado por hidrocarburos aromáticos y clorados, esteres y cetonas. Se disuelve completamente en cloroformo, di y tri cloroetano.

2. JUSTIFICACIÓN

En México se producen 28 millones de toneladas anuales de residuos sólidos provenientes de la industria del azúcar (70 %), de aceites comestibles (12 %), cervecera (9%), trigo (5%), café (2%), conservas (1%), y el resto de las industrias pesquera, aves y ganado, agave, maíz y manzana (Mario Molina, 2016). Aunque el residuo de agave es relativamente poco, implica alrededor de 200,000 toneladas anuales de plantas en el estado de Hidalgo (SIAP, 2006). Es un residuo que tiene componentes valiosos para diferentes industrias: la alimentaria, farmacológica, empaques, automotriz, construcción, bioenergía, entre otras. Actualmente los métodos de separación y purificación son importantes ya que se tiene la perspectiva de que la biomasa lignocelulósica puede ser la que sustituya al petróleo como fuente de diferentes productos químicos. Sin embargo, algunos de estos métodos tienen desventajas: son inespecíficos, costosos y algunos dañan al ambiente.

Por otro lado, la industria de los empaques recae sobre materiales plásticos derivados del petróleo, lo cual llega a ser un problema de interés económico y ambiental. En Europa existe la tendencia a consumir materiales reciclables, materiales reusables, materiales más ligeros y polímeros bioderivados (Johansson et al. 2012). Las fibras naturales pueden formar compositos con polímeros sintéticos, reforzando y mejorando las propiedades de resistencia de esos materiales.

La literatura reporta que se han elaborado compositos con fibras de algunas especies de agave como *A. sisilana* y *A. fourcroydes*, tomando como polímero de interés la celulosa presente, la cual es sometida a reacciones de copolimerización, esterificación o Kraff, utilizando monómeros hidrofóbicos como etileno y propileno, o usando monómeros hidrofílicos como epóxido y metilmetacrilato. En los copolímeros productos de reacción se han evaluado las propiedades mecánicas, térmicas y de biodegradabilidad principalmente. Por lo tanto, el aprovechamiento de la celulosa proveniente de plantas de agaves puede ser utilizada para elaborar empaques biodegradables, lo cual cobra importancia, porque sería una forma de empezar a sustituir empaques derivados del petróleo lo que conlleva a reducir el impacto ambiental, además de aprovechar este residuo renovable y biodegradable.

Por lo tanto, en este trabajo se planteó aplicar tratamientos físicos y fisicoquímicos básicos a un residuo de *Agave salmiana*, en una secuencia tal que permita la recuperación de algunos componentes en cada etapa, hasta llegar a un material lignocelulosico con la mayor cantidad de

celulosa amorfa. Para sintetizar posteriormente un copolímero entre celulosa y metilmetacrilato, por medio de una reacción de radicales libres. Evaluar finalmente los cambios en la microestructura y composición química de los residuos de agave, pencas de *A. salmiana*.

3. HIPÓTESIS

La aplicación de diferentes tratamientos de desintegración física y química (extracción etérea y acuosa, así como hidrólisis alcalina y oxidación con agentes blanqueadores) sobre hojas residuales de *Agave salmiana* generarán un material lignocelulosico con propiedades físicas, químicas y microestructurales idóneas que favorecerán su copolimerización con metacrilato de metilo por el método de injerto y mejorarán las propiedades térmicas, ópticas y de cristalinidad del material sintetizado que podrá ser utilizado como material de embalaje.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Obtener materiales compatibles para la copolimerización mediante tratamientos fisicoquímicos de residuos agroindustriales.

4.2 Objetivos específicos

1. Obtener lignocelulosas a partir de residuos *A. salmiana* por medio de extracción etérea y acuosa, hidrolisis alcalina y oxidación por blanqueamiento.
2. Determinar la composición química del material nativo y contenido de fibras lignocelulósicas.
3. Caracterizar los efectos que causa cada tratamiento de extracción sobre las fibras determinando color, grupos funcionales predominantes, estabilidad térmica y cristalinidad.
4. Evaluar cambios morfométricos de los materiales lignocelulósicos y copolímeros por medio de microscopia óptica y análisis de imágenes.
5. Determinar las propiedades de textura por microscopia electrónica de barrido.
6. Correlacionar el análisis de imágenes con análisis termogravimétrico.
7. Copolimerizar la fibra lignocelulósica con metacrilato de metilo.
8. Evaluar los copolímeros mediante con IR-TF, DRX, Análisis Termogravimétrico y Microscopía.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

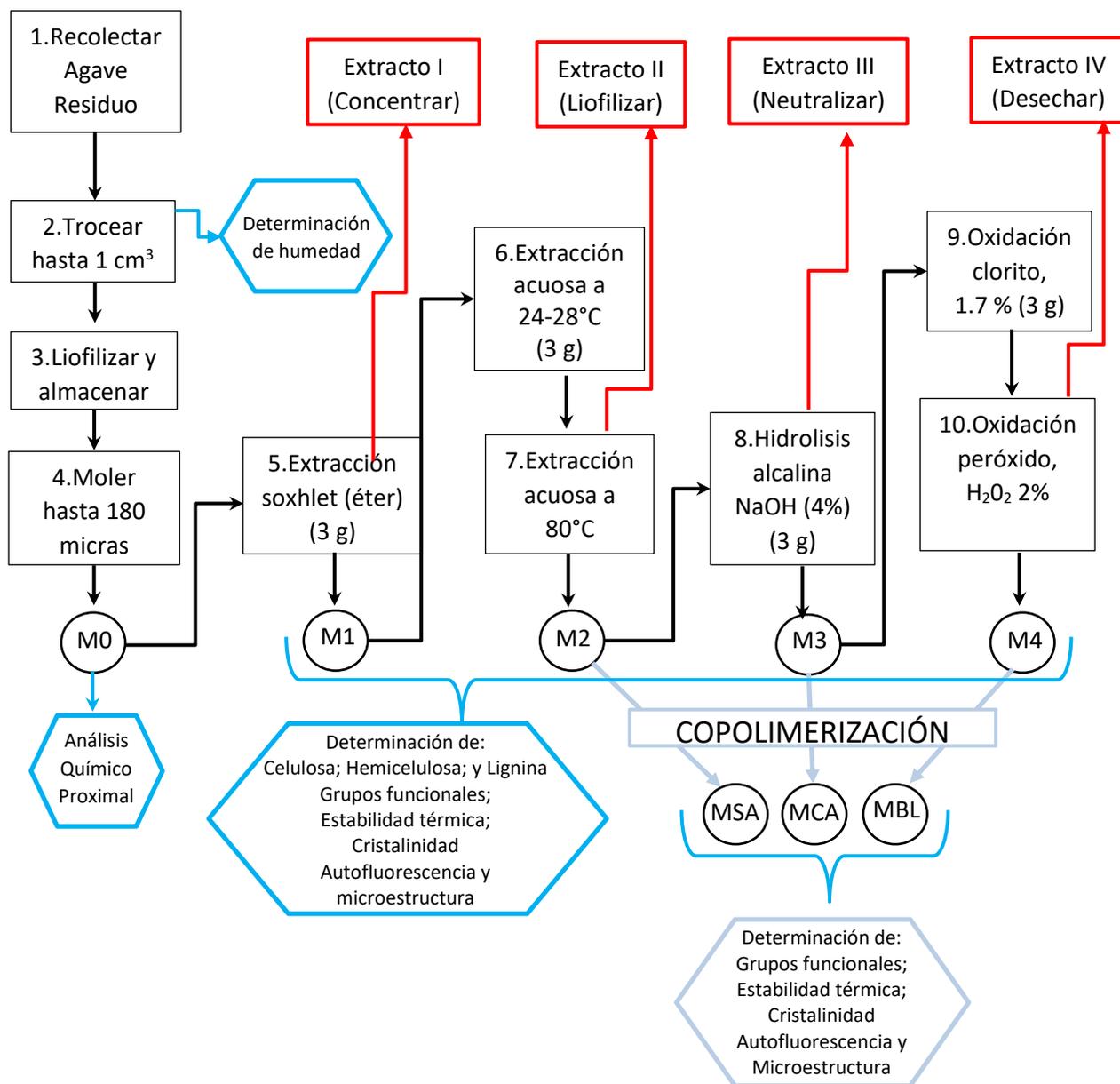


Fig. 9 Diagrama de flujo con la secuencia seguida para obtener lignocelulosas M0, M1, M2, M3 y M4, los copolímeros MSA, MCA y MBL y determinaciones realizadas.

5.1 Materiales y reactivos

Como materia prima se utilizó pencas de *A. salmiana* de 10 años. Estas se obtuvieron de la agroindustria del pulque y se recolectaron en Nanacamilpa, Tlaxcala (México). Fueron residuos de maguey, ya que la planta había dejado de producir aguamiel un mes atrás aproximadamente. Las

pencas se lavaron con agua para retirar polvo y se secaron con aire; se cortaron en piezas de 1 cm³, se homogenizó y se determinó humedad. La muestra restante se liofilizó y se almacenó en frascos herméticos a 4 °C. Como se esquematizan en la figura 9, etapas 1-3.

Los reactivos químicos usados en el tratamiento fisicoquímico fueron éter de petróleo (C₆H₁₄, marca Fermont), agua destilada (H₂O), hidróxido de sodio (NaOH, marca Meyer), clorito de sodio (NaClO₂ marca Reasol), peróxido de hidrógeno (H₂O₂, marca Reasol), etilendiaminotetracetato de sodio (EDTA-Na₂, marca Sigma) y sulfato de magnesio (MgSO₄, marca Reasol).

5.2 Tratamientos fisicoquímicos de *A. salmiana*

La materia liofilizada se molió en un molino Knifetec 1095 hasta obtener un tamaño de partícula menor a 180 µm con un tamiz del número 80. A esta muestra liofilizada y molida se nombró M0 y se determinó su composición, etapa 4, de la figura 9. Por otro lado, a la muestra pulverizada (3g) se le eliminaron diversos componentes a través de una serie de tratamientos:

- (i) Extracción continua con éter de petróleo por 6 h, el extracto I de la muestra se evaporó a temperatura ambiente (24-28°C) durante toda la noche. El peso final del sólido extraído se registró y esta lignocelulosa se nombró M1.
- (ii) Extracción de materia soluble en agua en dos etapas, la muestra desengrasada (M1, 3 g) se suspendió en agua destilada en una relación fibra/solución (1:10) a temperatura ambiente (24-28°C) por 2 h con agitación magnética constante. La mezcla fue centrifugada (10,304 g) a 4°C por 10 min, y re-suspendida en agua destilada en una relación fibra/solución (1:10) a 80°C por 30 min en agitación magnética constante (Santos et al. 2013). La mezcla fue centrifugada y lavada usando agua destilada a temperatura ambiente. El extracto II (acuoso) fue recuperado totalmente, una alícuota fue separada para determinar azúcares reductores y el resto se liofilizó y pesó. El sólido extraído fue secado en estufa a 100°C por 4 h; se registró el peso y esta lignocelulosa se etiquetó como M2.
- (iii) Hidrolisis alcalina de la materia (M2, 3g) dos veces con una solución de NaOH al 4% m/v en una relación fibra solución de 1:25 a 70-80°C por 2 h. La mezcla fue centrifugada a 927 g y 10°C por 20 min. El extracto III fue neutralizado para precipitar algunos componentes y descargar al desagüe sin contaminar. El sólido extraído fue lavado tres veces con agua destilada y secado en estufa a 100°C por 4 h (Rosli et al. 2013; Johar et al. 2012). El peso de la materia fue registrado y esta lignocelulosa se denominó M3. Finalmente,

(iv) Oxidación en dos etapas; la muestra hidrolizada (M3, 3g) fue blanqueada con una solución de NaClO₂ al 1.7% p/v en una relación fibra/solución 1:25 a 70-90°C por 4 h. La mezcla fue centrifugada a 10,304 g y el sólido fue lavado tres veces con agua destilada. Luego, la pulpa fue depositada en un tubo de centrifuga y se agregó H₂O₂ al 2%. La mezcla se calentó entre 70-90°C en baño maría por 20 min, y se agregaron las soluciones de EDTA sal disódica dihidratada al 1%, MgSO₄ al 2% y NaOH al 0.6% de acuerdo al método descrito (Rosli et al. 2013; Johar et al. 2012; Loureiro et al. 2011). La mezcla fue centrifugada (10,304 g, 10 min) lavada tres veces con agua destilada y secada a 100°C por 4 h. El extracto IV se desechó al desagüe. El sólido blanqueado se pesó y rotuló como M4. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado.

5.3 Análisis proximal de M0 y fibras en lignocelulosas

Para conocer la composición inicial del residuo, se aplicaron métodos AOAC 1995 (Association of Official Analytical Chemists) para humedad 934.01 32, cenizas 923.03 y extracto etéreo 920.39. La proteína total se determinó por el método Kjeldahl-Gunning-Arnold modificado, usando 6.25 como factor de conversión nitrógeno-proteína. Los azúcares reductores libres del extracto II (acuoso), fue cuantificado por espectrofotometría (Ting 1956).

Además, la variación del contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en cada tipo de lignocelulosa obtenida se evaluó por técnicas FOSS FibertecTM para fibra detergente neutra con base a la materia orgánica y α -amilasa (α NDFom) con base a los métodos AOAC 2002:04/ISO16472:2005, para la fibra detergente ácida (ADF) y lignina detergente ácida (ADL) por el método EN ISO 13906:2008. Todas las muestras fueron realizadas por triplicado.

5.4 Reacción de copolimerización

Se realizó en medio heterogéneo según el método y condiciones óptimas que propusieron (Singha & Rana 2010). Se utilizó 0.5 g del material lignocelulósico obtenido por los tratamientos de extracción acuosa (M2), hidrolisis alcalina (M3) y oxidación (M4). Cada material se suspendió en 100 mL de agua destilada a 45 °C por 24 h. Se pesó 360 mg de CAN (Nitrato de cerio (IV) y amonio) y se disolvieron en aproximadamente 2 mL de HNO₃ concentrado, se agregó a la suspensión y se mantuvo en agitación por 1 h. La suspensión se filtró en papel filtro y embudo Buchner. Se re-suspendió el material lignocelulósico que reaccionó con el catalizador, se agregó

1.9 mL de metilmetacrilato muy lentamente y se mantuvo en reacción por 2 h. El producto de la reacción se centrifugó a 10,000 rpm a 10°C por 10 min. El producto derivado del M2 se llamó MSA; el proveniente de M3 se nombró MCA; y el obtenido con M4 se registró como MBL. El material centrifugado se vertió en cajas Petri de plástico, se homogenizó la superficie y se secó en la estufa a 60°C por 6 h.

5.5 Análisis instrumental de lignocelulosas y copolímeros

A los materiales lignocelulósicos se les realizaron diferentes análisis instrumentales para identificar cambios en la estructura y composición, de acuerdo con los diferentes tratamientos del agave. Además de los materiales obtenidos por la reacción de copolimerización para demostrar la formación de nuevos enlaces.

5.5.1 Espectroscopia IR-TF

Las muestras de las fibras sin tratamiento (M0) y con tratamiento (M1, M2, M3, M4), además de los productos de la reacción (MSA, MCA y MBL) se analizaron por IR-TF en un espectrofotómetro Bruker Tensor 27. Las muestras se molieron, homogeneizaron y se comprimieron con bromuro de potasio para formar una pastilla. El análisis espectral se realizó entre 500 a 4000 cm^{-1} de número de onda.

5.5.2 Difracción de Rayos X (DRX)

Se empleó un difractómetro de Rayos X Bruker D8 advance Vantec, Alemania, usando una radiación $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), un filtro de Ni y un contador de centelleo como detector a 40 KV y 40 mA, con una rotación de 10 a 40 ° en la escala 2θ según la técnica descrita por (Singha & Rana 2010). Se empleó la técnica de polvos para analizar las muestras de material lignocelulósico y para el material copolimerizado.

El índice de cristalinidad (I.C.) se determinó utilizando los conteos de difracción a un ángulo 2θ entre 18 – 19° (intensidad mínima) y entre 22 – 23 ° (Intensidad máxima), usando la ecuación 1:

$$I.C. = \frac{I_c - I_a}{I_c}$$

ecuación 1

Donde I_c es la intensidad de la fracción cristalina (22 – 23 °) y la I_a es la intensidad de la fracción amorfa (18 – 19 °).

5.5.3 Análisis termo gravimétrico (TGA)

Se empleó un equipo de Termogravimetría (Equinox, Bruker, Finlandia) con un analizador térmico simultáneo (STA 409 PC Luxx, Netzsch, Alemania), para analizar la estabilidad térmica de las fibras de agave (M0, M1, M2, M3 y M4) y productos MSA, MCA y MBL. Se usaron aproximadamente 11 mg de cada muestra. Se utilizó un crisol DTA/TG de aluminio. Las condiciones generales fueron: flujo de Argón de 20 y 60 mL min⁻¹; calentamiento desde temperatura ambiente a 900 °C a una velocidad de flujo de 10 °C min⁻¹.

5.5.4 Colorimetría

Cada muestra (M0-M4) se depositó en una bolsa transparente de polipropileno y se colocó sobre el plano lector de colorímetro (CR-10, Konica Minolta, Japón) que utiliza un iluminante D₆₅ y un ángulo de observador de 10°. Se determinaron los parámetros de color L*, a* y b*. Éstos fueron medidos 10 veces en cada muestra. La diferencia de color (ΔE^*) entre tratamientos se determinó usando la ecuación 2 (Rodrigo et al. 2007; Marszałek et al. 2015) y el índice de color (CI) se estimó por la ecuación 3 (Vignoni et al. 2006). Además, la intensidad de color (C*) con la ecuación 4 y el ángulo de color (H*) por la ecuación 5 (Acosta-Montoya et al. 2010; Cesa et al. 2017).

$$\Delta E = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{\frac{1}{2}} \quad \text{ecuación 2}$$

$$CI = \frac{a^* \cdot 1000}{L^* \cdot b^*} \quad \text{ecuación 3}$$

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{\frac{1}{2}} \quad \text{ecuación 4}$$

$$H^* = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*} \quad \text{ecuación 5}$$

5.5.5 Microscopia confocal

Se utilizó un microscopio confocal Carl Zeiss modelo LSM 710 NLO con un fotomultiplicador GaAsP NDD como detector. Se utilizaron diferentes láseres de excitación 405 nm, 561 nm, 488 nm y 633 nm en un rango del 2 al 4 %, para determinar la autofluorescencia.

5.5.6 Microscopia electrónica de barrido de alta resolución (MEB-AR)

La microestructura de las muestras tratadas (M0-M4) se observó mediante un MEB-AR (Jeol modelo JSM-7800F, USA) operado a 5 kV y usando un detector LED. Cada muestra se cubrió con una capa de oro por 40 s previo al análisis.

5.6 Análisis de imágenes

Cinco micrografías con focales de 512x453 píxeles, RGB-JPG fueron tomadas para cada muestra (M0-M4), todas a la magnificación de 20X. Se empleó Image J versión 1.51a. Para el análisis de las imágenes se eliminó el margen de la imagen y se calibró la escala; se ajustó el umbral del color (rojo, verde o azul) para fragmentar la emisión de autofluorescencia en cada micrografía; Se transformó la imagen a blanco y negro para después convertirla a formato binario; finalmente, se analizaron las partículas para determinar sus parámetros morfométricos (área total, perímetro, circularidad, diámetro de feret y relación de aspecto). Con la misma imagen en formato binario se hizo el análisis fractal de área (dimensión fractal, DF_{BC} , y lagunaridad, λ_{LA}) usando el complemento FracLac que aplica el método Box Counting Fractal and Lacunarity Analysis. Por otro lado, de dos micrografías MEB-AR de 1280x1024 píxeles obtenidas a 10,000X para cada muestra (M0-M4), RGB-TIF, se obtuvieron 5 imágenes de 50x50 píxeles, 8 bits-JPG. Los parámetros fractales de textura (dimensión fractal, DF_{SB} , y lagunaridad, λ_{SB}) se determinaron aplicando el complemento FracLac que emplea el método Sliding Box Lacunarity Analysis y la variación diferencial del volumen (Gray 2: Grayscale).

Área.

Es el área de la selección en píxeles cuadrados o en unidades cuadradas calibradas (por ejemplo, mm^2 , μm^2 , etc).

Perímetro.

La longitud de la frontera externa de la selección. Con versiones IJ 1.44f y posteriores, el perímetro de una selección compuesta se calcula descomponiendo en selecciones individuales. Hay que notar que el perímetro compuesto y la suma de los perímetros individuales puede ser diferente debido al uso de diferentes métodos de cálculo.

Circularidad.

Calculado con la formula $4\pi \times \frac{[Area]}{[Perimetro]^2}$ con un valor de 1.0 se indica un círculo perfecto. Conforme el valor se acerque a 0.0, se indica un incremento de la forma alargada. Los valores pueden no ser válidos para partículas pequeñas.

Diámetro de Feret.

La distancia más larga entre dos puntos a través de la frontera seleccionada.

Relación de aspecto.

Relación entre el eje mayor y menor de la elipse ajustada a la partícula. Es decir, $\frac{Eje Mayor}{Eje Menor}$.

Dimensión fractal de área y lagunaridad.

Dimensión fractal de textura.

5.7 Análisis estadístico

Los datos de imagen fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA-una vía-medidas repetidas) y contraste de medias (Prueba de Tukey). El programa OriginPro 8 fue empleado para estimar las diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) entre las medias. Se determinó la correlación de Pearson usando xlstat entre las proporciones de fibra, los parámetros de color y los parámetros morfométricos y fractales derivados del análisis de imágenes.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Caracterización fisicoquímica de lignocelulosas

Las hojas de agave colectadas tenían un color verde–amarillo en su epidermis y blanca en la pulpa. Presentó una humedad del $86.08\% \pm 0.15$. Este valor fue cercano al reportado para agave maduro (89.5%) sin la extracción de aguamiel (Pinos-Rodríguez et al. 2008). La baja pérdida de humedad se explica por la habilidad inherente de la planta para retener agua (Linton & Nobel 2001). Esta es una característica relevante ya que permite la recuperación de componentes soluble (azúcares libres y otros) en el medio acuoso. Por otro lado, la biofibra liofilizada pierde $4.3\% \pm 0.3$ de su peso después de calentarse (100°C , 4h). Esta pérdida representa la fracción correspondiente a los componentes volátiles y/o agua intermolecular como se comprobó posteriormente por análisis termogravimétricos y análisis de infrarrojo. Este valor se usó para los cálculos en base seca. Después de liofilizada y pulverizada, la muestra presentó un olor herbáceo y un color amarillo.

La composición química de las hojas de agave se muestra en el Cuadro 1. Los principales componentes son $\alpha\text{NDF}_{\text{om}}$ (22.15% de celulosa, hemicelulosa y lignina) y azúcares reductores (26.47%) siendo la fructosa la fracción más grande. Pinos-Rodríguez et al. (2008) han reportado previamente 27.2% de NDF y 24.7% de azúcares reductores libres en hojas de *A. salmiana* madura. Esta diferencia se puede relacionar al uso de α -amilasa en este trabajo para hidrolizar y eliminar el almidón de la muestra M0, mientras que Pinos-Rodríguez et al. (2008) no empleó esta enzima.

Por lo tanto, hubo una alta concentración de azúcares, considerando que es una biomasa residual y que, por ejemplo, la cantidad de azúcares reductores en bagazo de *A. tequilana* fue más bajo (12.68%) (Arrizon et al. 2010). El extracto acuoso contenía $52.45\% \pm 0.91$ de sólidos. Este valor es más alto que el reportado para el aguamiel de *A. mapisaga* (11.5% materia seca) (Basurto-Ortíz et al. 2008).

Cuadro 1. Composición química de hojas de *A. salmiana* (M0)

Componentes individuales	% peso seco	Fracciones	% peso seco
α NDF _{om}	22.1 \pm 0.1	Celulosa	18.7 \pm 0.4
		Hemicelulosa	1.2 \pm 0.1
		Lignina	2.3 \pm 0.1
Azúcares reductores libres	26.5 \pm 0.9	Glucosa	7.7 \pm 1.4
		Fructosa	18.8 \pm 0.7
Proteína	5.1 \pm 0.3		
Ceniza	5.1 \pm 0.1		
Extracto etéreo	0.7 \pm 0.1		

Valores promedio \pm desviación estándar; n = 3; α NDF_{om}, Fibra detergente neutra, base a materia orgánica, usando α -amilasa;

Además, algunos autores indican que el extracto acuoso está compuesto de fructooligosacáridos (FOS) (Apolinário et al. 2014), pectinas (Santos et al. 2013) y minerales (Basurto-Ortíz et al. 2008) entre otros. Esto podría ser usado para recuperar azúcares con agua caliente como pretratamiento y convertirlos en bioetanol a través de fermentación (FitzPatrick et al. 2010). Además, el rendimiento de biofibras se podría mejorar mientras que el consumo de químicos en tratamientos posteriores se puede reducir. Sin embargo, el contenido de proteínas y ceniza fue baja (5%), dado que los minerales (Fe, Ca, K), proteínas, y aminoácidos (Santos-Zea et al. 2012) son obtenidos también durante el proceso de extracción de aguamiel de agave.

6.2 Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina

Es importante considerar que hay un incremento en la proporción de celulosa de 18.67% (M0) a 75.40% (M3) como se muestra en el Cuadro 2. Esto es debido a la extracción de ácidos y alcoholes grasos, esteroides libres y alcanos con éter (Gutiérrez et al. 2008) así como azúcares libres, FOS (Praznik et al. 2013), y parte de la hemicelulosa (Peng et al. 2012) por métodos acuosos en frío y caliente. Por su parte, la hidrólisis alcalina disuelve la materia amorfa compuesta por celulosa, hemicelulosa, lignina, y pectina (Le Troedec et al. 2008). Entonces, esta secuencia de tratamientos limpió, extendió y blanqueo la superficie de la biofibra dejando disponible la materia

lignocelulosica (Zhang et al. 2005). Rosli et al. (2013) ha reportado un incremento en la α -celulosa de *A. angustifolia* de 67% a 87% por hidrólisis alcalina y de 97% por blanqueo. Deepa et al. (2015) recuperó 38.8% de nanocelulosas de *A. sisilana* combinando el tratamiento alcalino, blanqueo e hidrólisis ácida. El alto rendimiento de celulosa (M3 y M4) es útil para recuperar materiales lignocelulosicos para definir la relación costo-beneficio cuando se aplica a biomateriales (Singh et al. 2015). Además, recuperando altos niveles de carbohidratos solubles (glucosa, fructosa, y FOS) podrían incrementar los beneficios.

Cuadro 2. Cambios en el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en residuo de *A. salmiana*.

(% Materia orgánica en base seca)			
Muestra	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
M0	18.67 ± 0.39^a	1.17 ± 0.09^a	2.30 ± 0.07^a
M1	18.18 ± 0.59^a	1.51 ± 0.22^a	2.28 ± 0.03^a
M2	52.90 ± 0.69^b	5.75 ± 0.76^b	7.53 ± 0.03^c
M3	75.40 ± 0.85^c	8.90 ± 1.20^c	4.20 ± 0.18^b
M4	78.88 ± 0.65^d	6.53 ± 0.13^b	5.16 ± 1.03^b

Valores promedio \pm desviación estándar, n = 3, letras diferentes en la columna muestra diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$), de acuerdo con la prueba de Tukey. Tratamientos consecutivos: M0 (sin tratamiento), M1 (extracción con éter de petróleo), M2 (extracciones acuosas at 25 y 80°C), M3 (hidrólisis alcalina con NaOH 4%), y M4 (blanqueamiento con 1.7% NaClO₂ y 2% H₂O₂).

El objetivo fue obtener un material lignocelulósico rico en celulosa ya que obtener celulosa nanocristalina (CNC) o celulosa microfibrilada (CMF) demanda mayores costos por el uso de reactivos para romper los enlaces del biocomposito natural. A través de estos tratamientos se reduce la masa debido a la pérdida de diferentes componentes, enriqueciendo la celulosa (78.88%). Por lo tanto, al incrementarse el número de los grupos hidroxilos se piensa que el material tratado puede utilizarse para obtener copolímeros entre este material lignocelulósico y metacrilato de metilo.

El cuadro 3, muestra que el rendimiento total del material lignocelulosico recuperado es bajo. Por lo que, con la intención de obtener el mayor aprovechamiento del residuo, se plantea la recuperación de algunos de ellos.

Cuadro 3. Rendimientos de material lignocelulósico con diferentes tratamientos.

	Tratamientos				
	Éter petróleo M1	Acuoso M2	Alcalino M3	Blanqueo M4	TOTAL M0-M4
Rendimiento, (% base seca)	99.27 ± 0.17	52.45 ± 0.91	33.44 ± 3.08	76.40 ± 4.06	12.89 ± 1.20

Valores promedio ± desviación estándar, n = 3. Tratamientos consecutivos: M0 (sin tratamiento), M1 (extracción con éter de petróleo), M2 (extracciones acuosas a 25 y 80°C), M3 (hidrólisis alcalina con NaOH 4%), y M4 (blanqueamiento con 1.7% NaClO₂ y 2% H₂O₂).

No se encontró reporte alguno sobre el rendimiento de estos tratamientos por lo que no se puedan comparar. Es importante conocer los rendimientos de recuperación de las fibras para estimar la viabilidad del proyecto a gran escala. Se propone recuperar tanto los azúcares como las hemicelulosas.

6.3 Caracterización estructural de lignocelulosa

6.3.1 Identificando enlaces químicos por IR-TF

La Figura 1, muestra el espectro infrarrojo de la materia lignocelulósica (M0-M4). Una banda de absorción típica (3280 cm⁻¹) entre 3250-3500 cm⁻¹ de la flexión de enlaces intermoleculares C-H y O-H que corresponden a grupos funcionales proveniente de ácidos y alcoholes grasos así como carbohidratos (Toledano-Thompson et al. 2005; Sain & Panthapulakkal 2006), observándose en todas las muestras. Sin embargo, la intensidad de la señal (% transmitancia) disminuye de M0 (0.17) a M4 (0.03) debido a los pretratamientos de extracción acuosa (carbohidratos solubles) y éter (ácidos y alcoholes grasos), así como también, hidrólisis alcalina y blanqueamiento de la biofibra. En consecuencia, el conglomerado de la lignocelulosa se debilita y hay un incremento de celulosa expuesta (Abraham et al. 2011). Mientras tanto, las bandas de absorción entre 2750 y 3000 cm⁻¹ debida a vibraciones típicas de estiramiento del enlace C-H y que corresponden a los anillos aromáticos y alcanos (Khalil et al. 2001) también muestran cambios en la intensidad debido a los tratamientos (Fig. 8).

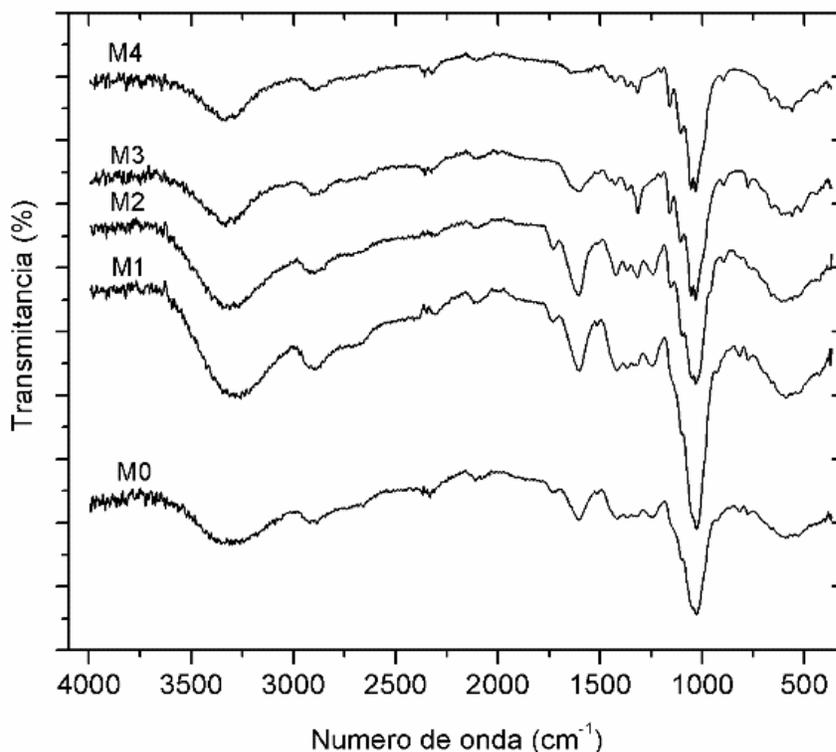


Fig. 8 Espectro IRTF de lignocelulosa de *A. salmiana*, en pastilla de KBr. Tratamientos consecutivos: M0 (sin tratamiento), M1 (extracción con éter de petróleo), M2 (extracciones acuosas a 25 y 80°C), M3 (hidrólisis alcalina con NaOH 4%), y M4 (blanqueamiento con 1.7% NaClO₂ y 2% H₂O₂).

Se debe observar que la banda de absorción entre 1500 y 1750 cm⁻¹, corresponde a la vibración de estiramiento del enlace C=O, disminuyó su intensidad (M0-M3) hasta casi desaparecer (M4). Este comportamiento es una consecuencia de la extracción de ácidos y alcoholes grasos usando éter de petróleo y agua, así como hidrólisis de pectina, hemicelulosa y lignina (Sain & Panthapulakkal 2006; Alemdar & Sain 2008; Sun et al. 2005). Esta señal es imperceptible después del tratamiento alcalino (M3) y blanqueo (M4) debido a la oxidación del enlace carbonilo provocado por clorito y peróxido (Elanthikkal et al. 2010). La banda de absorción (1516 cm⁻¹) que corresponde a la vibración C=C del anillo aromático de la lignina se encontró en mismo rango (Elanthikkal et al. 2010). Además, en el rango 1000-1250 cm⁻¹, hay una señal (1242 cm⁻¹) que coincide con el estiramiento fuera del plano del enlace C-O del arilo de lignina (Le Troedec et al. 2008) que reduce la intensidad de M0 (0.19) con el pretratamiento M1 (0.16) y M2 (0.12), pero principalmente con la hidrólisis alcalina M3 (0.09) y blanqueo (0.05) debido a la reducción de hemicelulosa y lignina. Algunos estudios reportan que el agua adsorbida por las fibras presenta señales en infrarrojo entre

1630 y 1650 cm^{-1} (Johar et al. 2012; Le Troedec et al. 2008). Sin embargo, en este estudio no se pudo determinar el estiramiento del enlace O-H (agua absorbida) en las muestras estudiadas debido a una señal de absorción amplia (1525-1700 cm^{-1}) con intensidad variable no permitió la observación de esta señal.

Todas las muestras exponen señales que son típicas de la celulosa en la región de huella dactilar (1500-500 cm^{-1}). En esta región, las bandas de absorción entre 1417 y 1426 cm^{-1} corresponde a la deformación asimétrica del enlace C-H (Elanthikkal et al. 2010). Esta señal se desplaza a números de onda más grandes debido al tratamiento alcalino (M3) y blanqueamiento (M4). En 1368 cm^{-1} observamos la flexión de los enlaces C-H y O-H de la celulosa (Marques et al. 2010); aunque también se han reportado en 1380 cm^{-1} (Alemdar & Sain 2008; Sun et al. 2005). La banda de absorción en 1315 cm^{-1} observado en M2, M3 y M4 es una consecuencia de las vibraciones de los enlaces C-C y C-O de la estructura anular de la celulosa. Sun et al. (2005) reporto esta señal en 1327 cm^{-1} para materia lignocelulosica en cáscara de trigo. La señal con la transmitancia más baja se observó entre 1021 y 1029 cm^{-1} para todas las muestras. La cual fue causada por la vibración en los enlaces C-O-C del anillo de piranosa (Elanthikkal et al. 2010). Mientras tanto, el cambio en 896 cm^{-1} observado en M2, M3 y M4 está relacionado a la vibración de los enlaces C-H y C-O causado por la deformación del enlace β -glicosídico-C-H, ayudado por la vibración anular y flexión de -O-H (Alemdar & Sain 2008; Nacos et al. 2006). Las bandas de absorción observados en 1052, 1104, y 1159 son resueltos después de la hidrólisis alcalina y el blanqueamiento. Elanthikkal et al. (2010) considera que entre más alta sea la resolución mayor es la cristalinidad de la celulosa.

6.3.2 Difractogramas e índices de cristalinidad

Los difractogramas M0 y M1 (Fig. 9) muestran un pico central entre 21.5° y 22.55° pero no son picos intensos, dado que la celulosa se encuentra en una baja proporción en relación con la materia amorfa (lignina, hemicelulosa y otros componentes). Los difractogramas M3 y M4 mostraron señales a 14.95°, 22.55°, 24.40°, y 34.90°. Además, se sabe que la celulosa tipo I muestra difracciones aproximadamente a 14°, 16°, 23°, y 35° (Ouajai & Shanks 2005); mientras que la celulosa tipo II muestra señales a 11, 20, 22 y 37° en la escala 2θ (Qin et al. 2008). Los ángulos de difracción de M3 y M4 indica que la fracción cristalina de la celulosa es del tipo I, lo cual concuerda con lo reportado por Oudiani et al. (2011) reportada para la biofibra de *A. americana*.

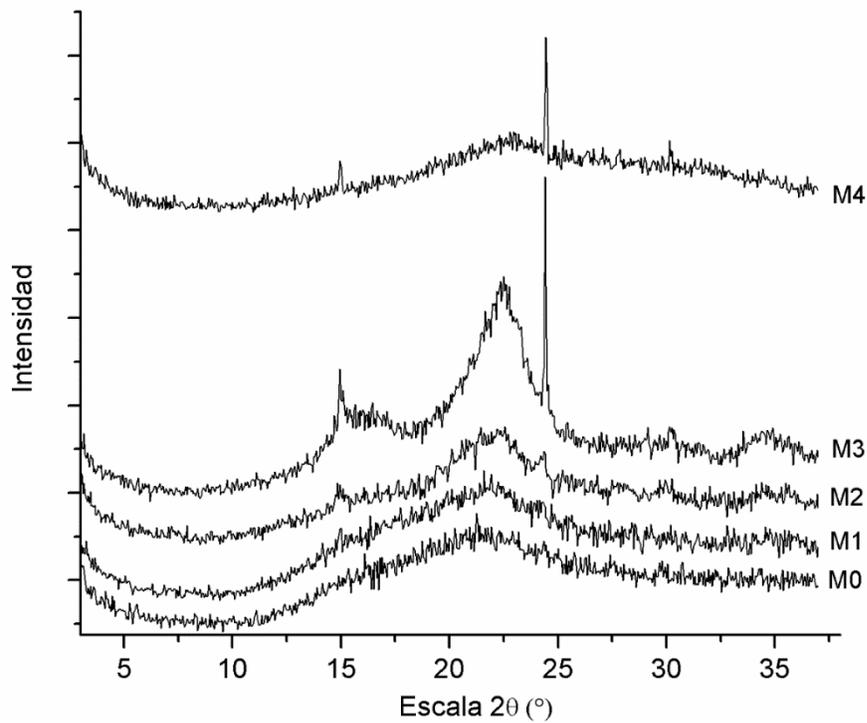


Fig. 9 Difractogramas de lignocelulosas de *A. salmiana*, técnica de polvos. Tratamientos consecutivos: M0 (sin tratamiento), M1 (extracción con éter de petróleo), M2 (extracciones acuosas a 25 y 80°C), M3 (hidrólisis alcalina con NaOH 4%), y M4 (blanqueamiento con 1.7% NaClO₂ y 2% H₂O₂).

Por otro lado, el pico estrecho de 24.40° en M3 y M4 se debe a impurezas, considerando que se han reportado impurezas inorgánicas de SiO₂ y CaCO₃ a 14.5° y 25.5° para lignina residual oxidada con clorito de sodio en el plano (1 0 1); aunque esto no se ha reportado en tratamientos con NaOH entre 2-20% (Ben Sghaier et al. 2012).

Cuadro 4. Índices de cristalinidad estimados con el método de Segal (Kaushik et al. 2010)

	2θ (am) (°)	I_{am} (Conteo)	2θ (002) (°)	I₀₀₂ (Conteo)	Índices de cristalinidad, %
M0	18.05	197	22.30	279	29.39
M1	18.10	224	22.25	326	31.29
M2	18.00	154	22.55	321	52.02
M3	18.75	182	22.50	565	67.79
M4	18.35	121	22.80	236	48.73

am, fase amorfa de la celulosa; 002, fase cristalina de la celulosa. Tratamientos consecutivos: M0 (sin tratamiento), M1 (extracción con éter de petróleo), M2 (extracciones acuosas at 25 y 80°C), M3 (hidrólisis alcalina con NaOH 4%), y M4 (blanqueamiento con 1.7% NaClO₂ y 2% H₂O₂).

Hay un incremento en el porcentaje del índice de cristalinidad, el mayor fue para M3 (hidrólisis alcalina). Este incremento en cristalinidad se atribuye a dos efectos: a) eliminación progresiva de algunos constituyentes amorfos como azúcares libres, hemicelulosa y lignina fácilmente hidrolizable; y b) el rearrreglo de la región cristalina a una de naturaleza más cristalina (Ben Sghaier et al. 2012; Johar et al. 2012; Rosli et al. 2013). Sin embargo, el blanqueo tiene un efecto contrario, ya que el índice de cristalinidad disminuye de 67 a 48% para M4. Este resultado es opuesto a lo reportado por otros autores que estudiaron cascarilla de arroz (Johar et al. 2012) y fibra de agave (Rosli et al. 2013) usando hidróxido de sodio (4%) como primer etapa y clorito de sodio (1.7%) como blanqueamiento. Sus resultados mostraron un incremento (50.2-56.5 y 69-74%) del porcentaje del índice de cristalinidad. Sin embargo, aquí usamos una combinación de métodos de blanqueo, el primero con clorito de sodio y el segundo con peróxido de hidrógeno. En esta tecnología verde el anión perhidroxilo (HOO⁻) elimina grupos carbonilos conjugados de la lignina y los radicales hidroxilos (HO[·]) y peroxilos ([·]O₂) producen una descomposición oxidativa de los anillos aromáticos de la lignina.

La reactividad de los radicales en la lignina es ligeramente más alta que en la celulosa. Además, si el peróxido de hidrógeno se descompone demasiado rápido, la concentración de radicales llega a ser alta y se produce la degradación de la celulosa y lignina (Bajpai 2012). Algunos metales de transición catalizan estas descomposiciones por lo que algunos autores han propuesto proteger la

celulosa agregando quelante como el EDTA y sales de magnesio (Loureiro et al. 2011) durante el blanqueo con peróxido de hidrógeno. Por lo tanto, incrementando la celulosa amorfa y/o evitando su degradación resultará en una disminución del índice de cristalinidad.

6.3.3 Termogramas y estabilidad térmica

La estabilidad térmica de lignocelulosa de *A. salmiana* fue monitoreada por curvas termogravimétricas (Fig. 10a). De las mediciones, se crearon los espectros termogravimétricos diferenciales (Fig. 10b). Los termogramas de M0 y M1 son similares entre sí, pero diferentes de M2-M4 (Fig. 10c). Se observa un pico en M0 y M1 a una temperatura de 208°C, los cuales desaparecen en los espectros M2-M4. Esto se debe a la pérdida de componentes grasos (extracción con éter de petróleo) e hidrosolubles (extracción acuosa). También en M2-M4, observamos un pico ancho (210-380°C) relacionado a la pirolisis de hemicelulosa y celulosa (Carrier et al. 2011), el cual fue más intenso para M3 a 340°C lo que significa que esta muestra es térmicamente más estable. Este comportamiento es causado principalmente por un alto contenido de celulosa y la cristalinidad más alta ocasionada por el tratamiento alcalino. Además, el pico más alto para M4 fue a 320 °C, 20°C por debajo de lo reportado para M3, atribuible al hecho de que los cambios en la celulosa cristalina ocurridos durante la degradación de lignina por el blanqueo. La muestra M4 también mostró picos entre 400 y 600 °C debido a las fracciones de lignina formadas por su oxidación.

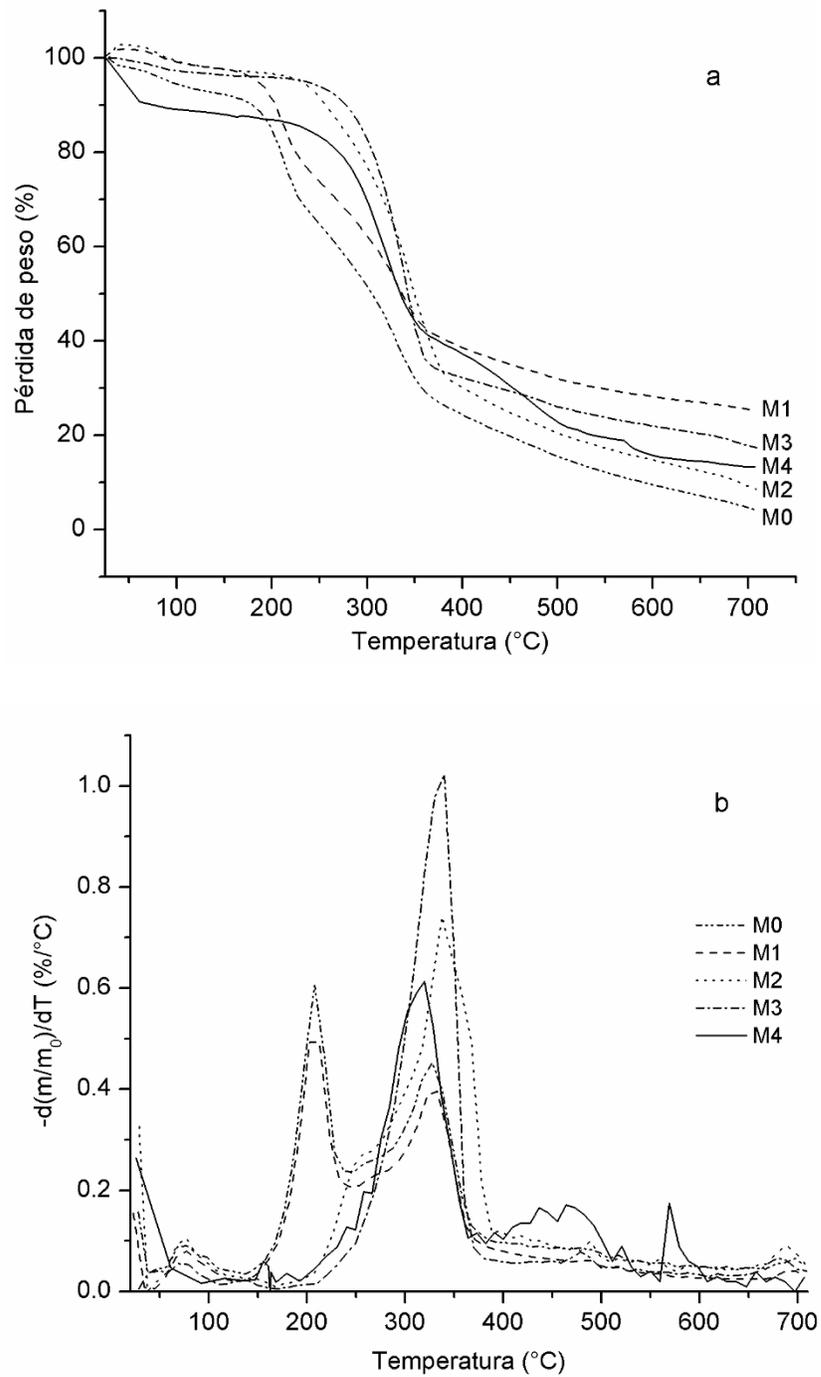


Fig. 10 Estabilidad térmica de la lignocelulosa de *A. salmiana*. (a) Curvas termogravimétricas y (b) espectro termogravimétrico diferencial. Tratamientos consecutivos: M0 (sin tratamiento), M1 (extracción con éter de petróleo), M2 (extracciones acuosas at 25 y 80°C), M3 (hidrólisis alcalina con NaOH 4%), y M4 (blanqueamiento con 1.7% NaClO₂ y 2% H₂O₂).

Las curvas termogravimétricas confirman el comportamiento pirolítico (Fig. 10a). A temperaturas <100°C, observamos pérdidas de masa de 2-10% (M0-M4), la muestra M4 sufrió la pérdida más grande (10%). Estas pérdidas podrían explicarse por la evaporación de agua y la presencia de sustancias volátiles. En temperaturas entre 170 y 380°C, tuvo lugar una pérdida de masa más rápida (45-65%), siendo M0 la muestra que mostró la estabilidad térmica más baja al compararse con M3, la cual registró la estabilidad más alta. La degradación en M0 fue causada por un mayor número de componentes termosensibles (lípidos y azúcares libres) todavía presentes en la biofibra. En temperaturas inferiores a 380°C los carbonos de la lignina son oxidados (Amar Singh Singha & Rana 2010; Tronc et al. 2007), mostrando una reducción lenta y gradual en la pérdida de masa. Finalmente, a 700°C entre el 80 y 90 % de la lignocelulosa es volatilizada. Este comportamiento pirolítico de las biofibras de *A. salmiana* es como el reportado por Carrier et al. (2011) quien observó que la pérdida de masa más grande en madera álamo y helecho es producida entre 300-350°C, donde la hemicelulosa es degradada a 200-300°C, α -celulosa en 250-350°C y lignina en 200-500°C. Similarmente, Tronc et al. (2007) sostuvo que *Agave tequilana* Weber azul es degradada alrededor de 350°C mientras que lo mismo ocurre para la lignina en temperaturas por arriba de 450°C. Después de estos análisis, se determinó que la hidrólisis alcalina provee más estabilidad térmica a la materia lignocelulósica, que la lignocelulosa blanqueada pierde resistencia térmica y reduce el índice de cristalinidad, aun cuando se mejora considerablemente la blancura. El último proceso se podría omitir si se desea un índice de cristalinidad alto para usarse en materiales como refuerzo. Por otro lado, la materia blanqueada podría utilizarse para producir biocombustibles o copolímeros por engrapado donde se prefiere la celulosa amorfa porque se facilita la reacción enzimática o el engrapado se incrementa.

6.3.4 Parámetros, cambios, índices, intensidad y ángulo de color de las lignocelulosas

En el cuadro 5, se presentan los valores de los parámetros de color (L, a, b) de acuerdo con el modelo cromático CIELab. Se observa reducción significativa en la luminosidad (L^*) después de la extracción con éter de petróleo (M1, 73) y agua (M2, 65), ocasionada por la eliminación de ácidos grasos y carbohidratos solubles, y como consecuencia la lignina que cubre a las fibras de la celulosa (Mwaikambo & Ansell 2002) es expuesta, ocasionando oscurecimiento del material lignocelulosico.

Por el contrario, un incremento estadísticamente significativo en la luminosidad de M3 (66) a M4 (86) se produce por eliminación de lignina con el proceso de blanqueamiento (Elanthikkal et al. 2010). Por otro lado, el componente cromático (a^*) en la escala del rojo de la biofibra (M0, +1.2) aumento después de extracción con éter de petróleo (M1, +3.6) y agua (M2, +4.28), pero se redujo después de la hidrólisis alcalina (M3, +2.0), incluso con tendencia al verde después del proceso del blanqueado (M4, -1.15). Mientras que el componente cromático (b^*) en la escala del amarillo de la biofibra (M0, +20) disminuyó ligeramente después de los tratamientos consecutivos (M4, +15). A nuestro saber, esta es la primera vez que se reportan los parámetros y coeficientes de color de la biofibra de *A. salmiana* hidrolizada y con blanqueamiento, ya que anteriormente solo se reportó el efecto del blanqueado por simple percepción visual (Tovar-Carrillo et al. 2014; Rosli et al. 2013; Johar et al. 2012) y no usando un sistema cromático como CIELab o RGB.

Cuadro 5. Parámetros de color de acuerdo al modelo cromático CIEL*a*b* de muestras en polvo pencas de *A. salmiana* tratadas.

Sample	Color Parameters, CIEL*a*b*		
	L*	a*	b*
M0	75.70 ± 0.91 ^b	1.20 ± 0.12 ^a	19.45 ± 0.17 ^b
M1	73.16 ± 0.39 ^c	3.59 ± 0.22 ^b	21.53 ± 0.83 ^c
M2	65.48 ± 0.28 ^a	4.28 ± 0.11 ^c	16.34 ± 0.12 ^a
M3	66.90 ± 2.55 ^a	2.02 ± 0.34 ^d	16.50 ± 1.25 ^a
M4	86.02 ± 0.51 ^d	-1.15 ± 0.15 ^e	15.06 ± 0.71 ^d

Valores promedio ± desviación estándar, n = 10, diferentes letras en la misma columna muestran diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$), de acuerdo con la prueba de Tukey. Luminosidad (L*); (a y B*); Tratamientos consecutivos: M0 (sin tratamiento), M1 (extracción con éter de petróleo), M2 (extracción acuosa a 25 y 80 °C), M3 (hidrólisis alcalina con NaOH al 4%) y M4 (blanqueamiento con NaClO₂ al 1,7% y H₂O₂ al 2%).

Con las ecuaciones 1-4, se determinaron: (i) diferencias de color respecto al tratamiento, (ii) índice de color, y para el modelo CIELCh: (iii) Intensidad de color (C) y (iv) apariencia de color (ángulo h). Las diferencias de coloración (ΔE) de las biofibras respecto a la fibra inicial, son mayores con la extracción acuosa (11.13) y blanqueamiento (11.47). Aunque el cambio de color con el tratamiento alcalino (M3, 9,67) es alto, no es estadísticamente significativo, para $p < 0.05$, con la muestra de extracción acuosa (M2), pero sí lo es con la muestra del blanqueamiento (M4). De igual manera, M2, M3 y M4 son estadísticamente significativos con respecto a M1. Esto significa que los compuestos que son eliminados o que forman la nueva superficie de la fibra tratada influyen en los parámetros de color, tanto en la luminosidad (L*) y los componentes cromáticos entre verde-rojo (a*) y entre azul-amarillo (b*) no muestra diferencia estadística entre tratamientos.

De acuerdo con los índices de color (IC), el color se incrementó desde M0 (0.81) hasta M2 (4.00), cambia en M3 (1.82) y M4 (-0.89), todas las muestras son estadísticamente diferentes para $p \leq 0.05$ de acuerdo con la prueba de Tukey. Esto implica que las muestras M0, M3 y M4 son amarillo-verdosas (IC -2 a +2) y las muestras M1 y M2 van de amarillo-pálido a naranja-intenso (IC +2 a

+20) Vignoni et al. (2006). Las extracciones acuosas y con éter dejaron en la superficie compuestos con grupos aromáticos como la lignina, que favorecieron valores altos de los componentes cromáticos y bajos valores de luminosidad. Por otro lado, con la hidrólisis y blanqueamiento se oxidan y fragmentan estas estructuras, dejando la celulosa con menos sustancias en la superficie reduciendo así los valores cromáticos y aumentando la luminosidad.

La intensidad de color (C^*) aumenta ligeramente con la extracción con éter (M0, 18.48; M1, 21.83) y reduce con los tratamientos posteriores, aunque entre M2 y M3 no hay una diferencia significativa. Esto es consecuencia de la eliminación consecutiva de los componentes, que a su vez ocasiona menor saturación de color en las muestras. Se percibe información diferente si se analizan los componentes cromáticos por separado, pero al determinar la intensidad de color se evalúa el cambio conjunto de éstos que es más cercano a lo percibido por el ojo humano.

Cuadro 6. Índices, intensidad, ángulo y cambios de color de pencas de *A. salmiana* tratadas

Sample	CIEL* C^*h^*			
	ΔE	CI	C^*	h^*
M0	---	0.81 ± 0.08^a	19.48 ± 0.18^b	1.51 ± 0.006^a
M1	4.22 ± 0.72^c	2.28 ± 0.20^b	21.83 ± 0.80^c	1.40 ± 0.014^b
M2	$11.13 \pm 0.92^{a,b}$	4.00 ± 0.12^c	16.89 ± 0.11^a	1.31 ± 0.007^c
M3	9.67 ± 2.18^a	1.82 ± 0.25^d	16.63 ± 1.28^a	1.44 ± 0.013^d
M4	11.47 ± 1.36^b	-0.89 ± 0.13^e	15.10 ± 0.70^d	-1.49 ± 0.012^e

Valores promedio \pm desviación estándar, n = 10, diferentes letras en la columna muestran una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), de acuerdo con la prueba de Tukey. Cambio de color (ΔE) relacionado con M0; Índice de color (CI); Cromo (intensidad del color, C^*); y Hue (ángulo de color, h^*). Tratamientos consecutivos: M0 (sin tratamiento), M1 (extracción con éter de petróleo), M2 (extracción acuosa a 25 y 80 °C), M3 (hidrólisis alcalina con NaOH al 4%) y M4 (blanqueamiento con NaClO₂ al 1,7% y H₂O₂ al 2%)

En cuanto al ángulo de color (h^*) las muestras M0-M3 presentaron valores alrededor de 1.4° lo que significa que dentro del modelo cromático CIELCh se ubican en el cuadrante rojo-amarillo, éste cambia drásticamente con el blanqueamiento a -1.5° lo que implica un cambio en la tonalidad hacia el cuadrante verde-amarillo.

6.4 Caracterización microestructural de las lignocelulosas

Con la microscopia electrónica de barrido de alta resolución (MEB-AR) se obtuvieron los diferentes grados de desintegración de las muestras lignocelulósicas de *A. salmiana* (M0-M4) con respecto a los tratamientos. Las muestras M0 y M1 son estructuralmente similares, se presentan como aglomerados gruesos de fibras cementadas por otros componentes. Esto podría ser porque la extracción con éter solo elimina algunos componentes no polares en un bajo porcentaje (0.8 %). En las muestras M2 se comienza a ver una desintegración del material, con las microfibrillas separadas y en forma de espiral, ya que los componentes polares hidrosolubles como carbohidratos (42 %) son eliminados. Para la muestra M3, donde la celulosa se incrementó (75%), se observa una nueva aglomeración y un recubrimiento fino del material esto fue ocasionado porque el tratamiento alcalino eliminó hemicelulosas y parte de ligninas para facilitar aglomeración de celulosa. Finalmente, aunque en M4 se siguen apreciando láminas aglomeradas son más finas que las correspondientes en M3 pero además se percibió una expansión, que se relaciona con una disminución en la cristalinidad.

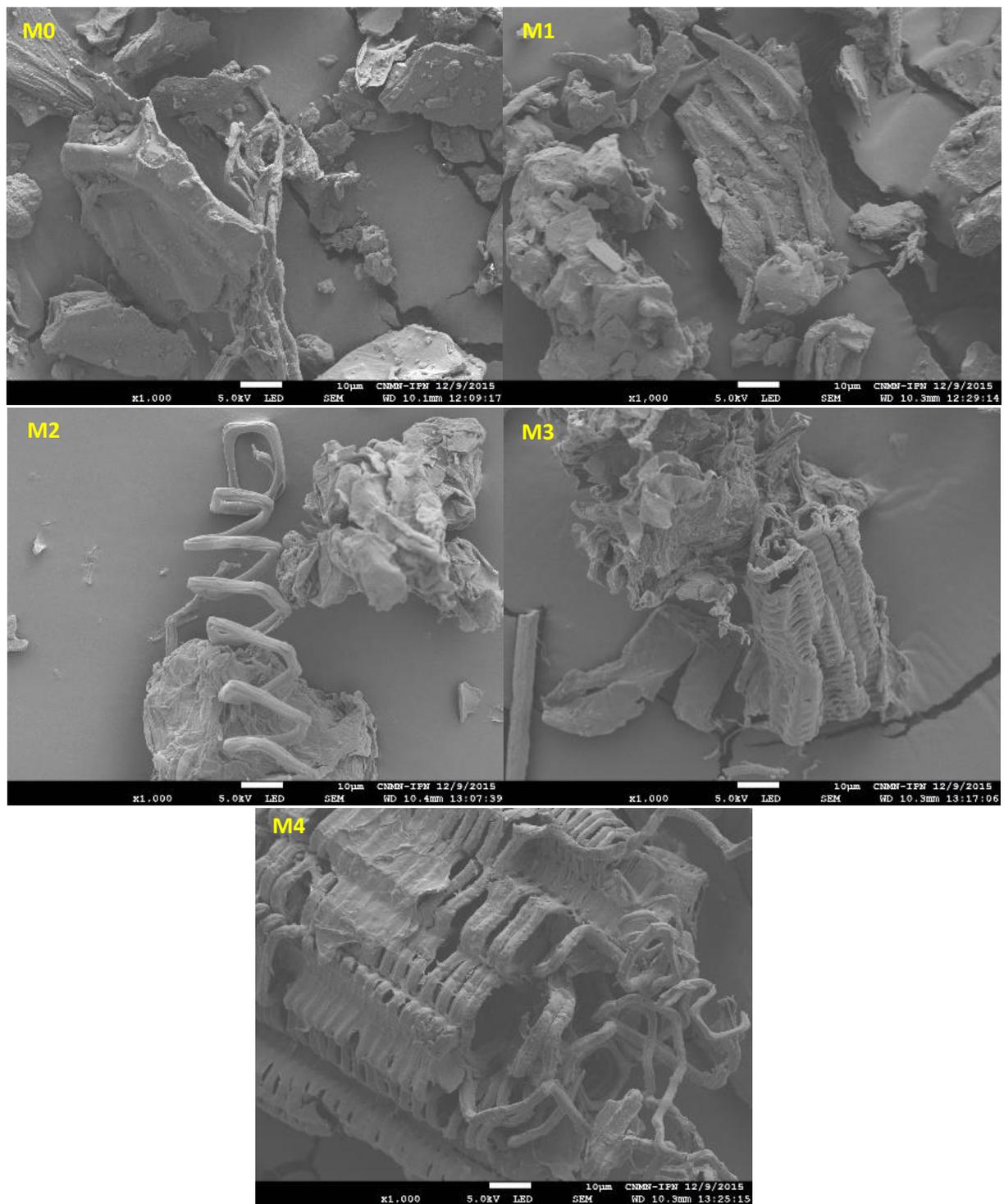


Fig. 11 Micrografía MEB-AR (1000X) que muestra cambios estructurales para lignocelulosas. Tratamientos consecutivos: M0 (sin tratamiento), M1 (extracción con éter de petróleo), M2 (extracciones acuosas at 25 y 80°C), M3 (hidrólisis alcalina con NaOH 4%), y M4 (blanqueamiento con 1.7% NaClO₂ y 2% H₂O₂).

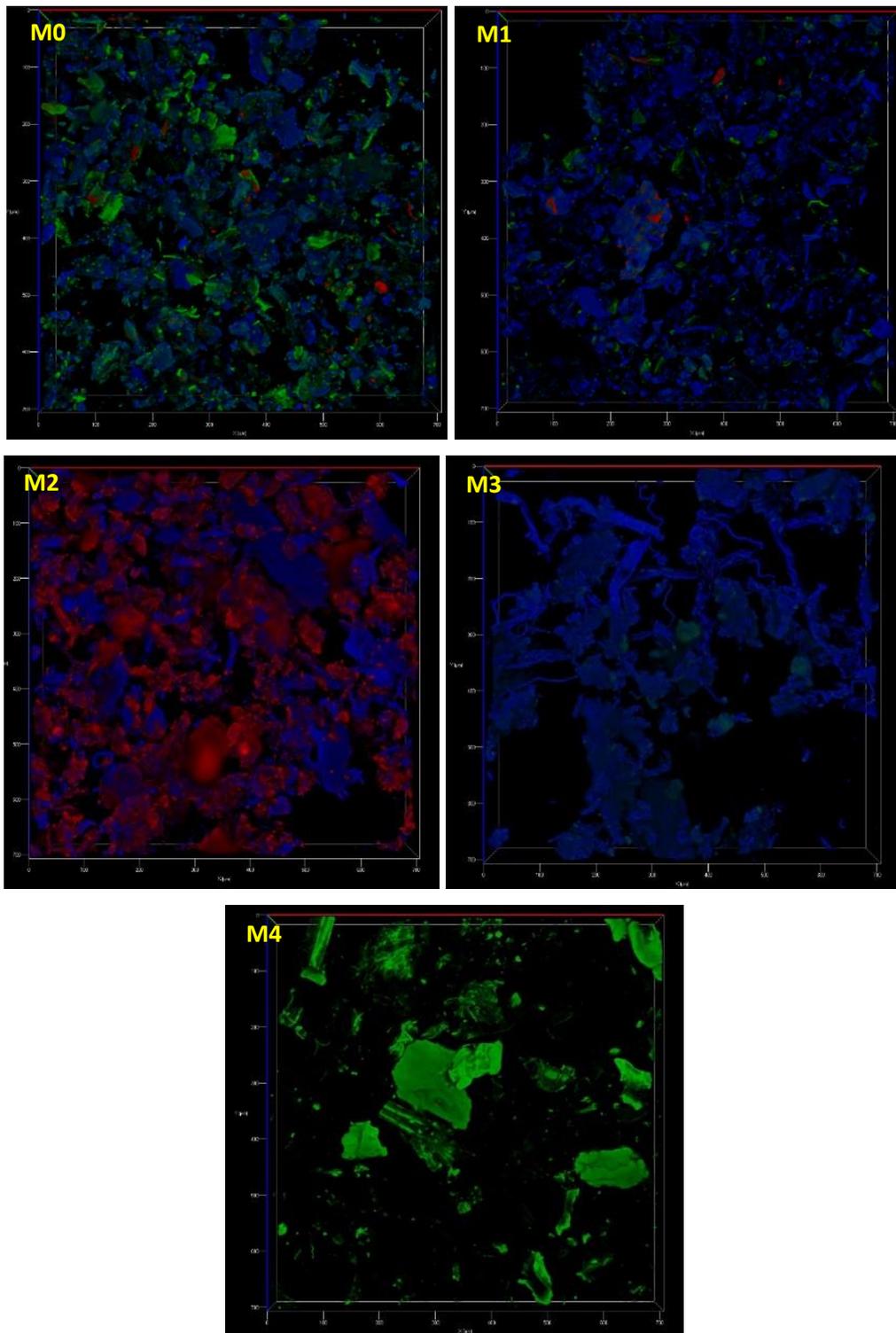


Fig. 12 Micrografía con focal (20X) que muestra cambios de autofluorescencia para lignocelulosas. Tratamientos consecutivos: M0 (sin tratamiento), M1 (extracción con éter de petróleo), M2 (extracciones acuosas at 25 y 80°C), M3 (hidrólisis alcalina con NaOH 4%), y M4 (blanqueamiento con 1.7% NaClO₂ y 2% H₂O₂).

Las micrografías confocal (Fig. 12) y los espectros de emisión de autofluorescencia de 420-720 nm (Fig. 13) de las lignocelulosas de *A. salmiana*, presentaron cambios con respecto a los tratamientos aplicados. En la muestra M0 se aprecian tres tipos de emisiones de autofluorescencia: azul (420-490nm), verde (490-560nm) y roja (625-720). A simple vista, en M0 predominan autofluorescencias azul y verde; para M1 prevalece la autofluorescencia azul; en M2 se incrementa notablemente la emisión roja. En la muestra M3 domina la emisión azul sobre la verde y en M4 es principalmente emisión azul.

Aunque la autofluorescencia en biomasa se debe a la presencia de diferentes componentes como son: nucleótidos, flavonoides, antocianinas, clorofila, algunas proteínas, celulosa y lignina se ha utilizado poco para conocer la distribución de estos componentes después de los tratamientos de la biomasa no maderable.

Se ha reportado que para muestras vegetales la emisión de autofluorescencia azul se debe principalmente a la presencia de celulosa (420-430nm) (Roshchina 2012) y lignina (455nm) (Donaldson 2013). Por su parte, la autofluorescencia verde se presenta por terpenos, alcaloides y flavonoides (470-525nm) y flavinas (520nm) (Roshchina 2012) y lignina (530-545nm) (Donaldson 2013). La autofluorescencia roja se debe a clorofilas (675-680nm) (Roshchina 2012) lignina (580nm) (Donaldson 2013) y poliacetilenos, isoquinolinas, alcaloides acridoneos (570-655nm) (Roshchina 2012).

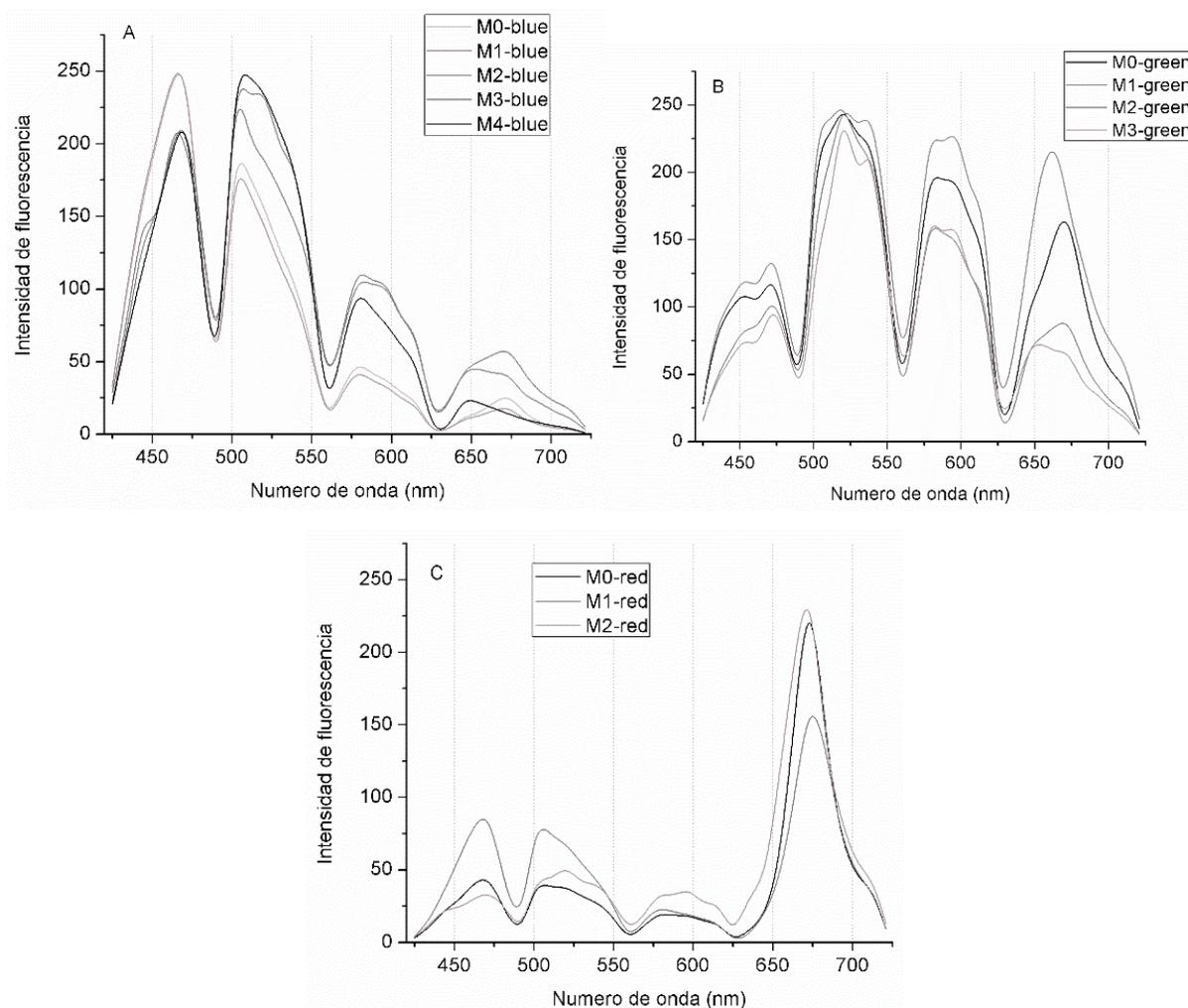


Fig. 13 Espectros de emisión de fluorescencia azul (A), verde (B) y roja (C). Tratamientos consecutivos: M0 (sin tratamiento), M1 (extracción con éter de petróleo), M2 (extracción acuosa a 25 y 80 °C), M3 (hidrólisis alcalina con 4 % NaOH), y M4 (blanqueo con 1.7 % NaClO₂ and 2 % H₂O₂). Los espectros M4 verde y M3 y M4 rojo no se obtuvieron porque no se detectó a simple vista emisión de este tipo en estas muestras.

6.5 Análisis de imagen de autofluorescencia de los materiales lignocelulosico

Las imágenes de autofluorescencia se analizaron para determinar la influencia de cada tratamiento sobre los componentes y su distribución. Aunque una misma fluorescencia puede deberse a dos o más compuestos diferentes puede detectarse influencias importantes y que pueden explicar ciertos resultados que han sido solo analizados directamente.

6.5.1 Área total de fluorescencias

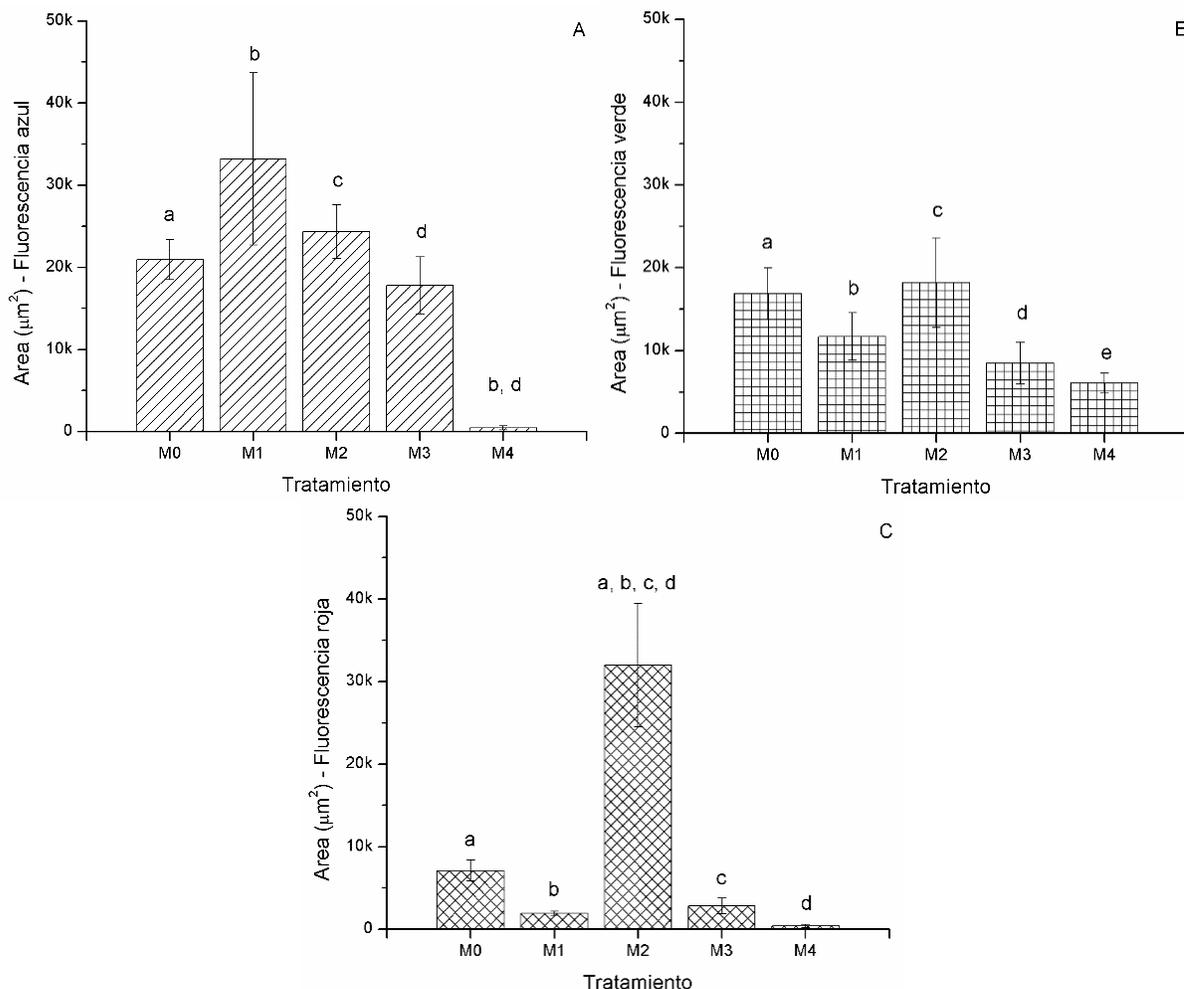


Fig. 14 Área de partículas de fluorescencia azul (A), verde (B) y roja (C), de residuo de agave sin tratamiento (M0) y lignocelulosas después de diferentes tratamientos (M1, M2, M3, M4).

El área total representa de forma indirecta la cantidad de los componentes que fluorescen en azul, verde o rojo, en este estudio. De acuerdo con las medias, la fluorescencia azul tiene alrededor de $30,000 \mu\text{m}^2$ la cual corresponde a la muestra M1. En los tratamientos posteriores ocasionan una reducción en la cantidad de esta sustancia. Como la fluorescencia azul puede deberse principalmente a celulosa o lignina (Roshchina 2012; Donaldson 2013) y debido a la reducción que se tienen en el área de este tipo de fluorescencia de M1-M4, entonces debe corresponder a lignina ya que por análisis fisicoquímicos se determinó, que la celulosa se incrementa con estos tratamientos. La muestra con blanqueamiento (M4) tiene diferencia estadística con M1 y M3, alcanzando M4 un área por debajo de $100 \mu\text{m}^2$.

La fluorescencia verde representada por terpenos, alcaloides, flavonoides, flavinas y lignina (Roshchina 2012; Donaldson 2013), disminuye con los diferentes tratamientos. Estos componentes y las clorofilas se reducen gradualmente por los tratamientos M1 (extracción no polar) y M2 (extracción acuosa). Sin embargo, debido a que la lignina no se solubiliza en estos dos tratamientos, ésta se concentra en la muestra M2. La cual es abatida con el tratamiento alcalino y blanqueamiento ya que la lignina es soluble en álcali caliente y oxidada con peróxido de hidrógeno.

La fluorescencia roja en plantas se presenta principalmente por la presencia de clorofila y lignina (Roshchina 2012; Donaldson 2013). El área de la fluorescencia roja es estadísticamente mayor para la lignocelulosa de la muestra M2, aunque no hay presencia de clorofila porque se han eliminado con la extracción no polar y acuosa. Este resultado muestra que la lignina queda en la superficie de la fibra, además que el tratamiento alcalino es efectivo en la remoción o fragmentación de esta macromolécula.

6.5.2 Perímetro de partículas

Este parámetro representa el perímetro promedio de las partículas, es decir, puede interpretarse como el tamaño promedio o grado de fragmentación o distribución de los componentes que representan cierta fluorescencia. La fluorescencia azul que se ha asignado aquí corresponde a lignina, el perímetro en M4 es menor a 10 micras y diferente estadísticamente a M0, M1, M2 y M3 con un perímetro entre 30 y 40 micras esto puede indicar una reducción del tamaño macromolecular de la lignina ocasionada por los tratamientos M2 y M3. Para la fluorescencia verde que también se ha asignado para la lignina se tiene que el perímetro para M4 se incrementó a 50 micras marcando una diferencia significativa con las muestras de M0-M3 que tuvieron un perímetro de alrededor de 15 a 25 micras. Al relacionar este perímetro grande con el área pequeña de la M4 del espectro verde, se puede decir que la lignina fluorescente verde se recondensa después del fraccionamiento cubriendo la superficie de la celulosa, por ser la fibra más abundante en M4, generando perímetros grandes, aunque el área sea pequeña. Por su parte, el perímetro de la fluorescencia verde tiene una media de 35 micras y es diferente a los tratamientos M0, M1, M3 y M4 con perímetro entre 8-15 micras. Al observar estas diferencias en el comportamiento de la lignina en diferentes longitudes de onda, se puede decir que se trata de diferente conformación o fragmentos de la lignina ya que es un polímero amorfo y de composición variada.

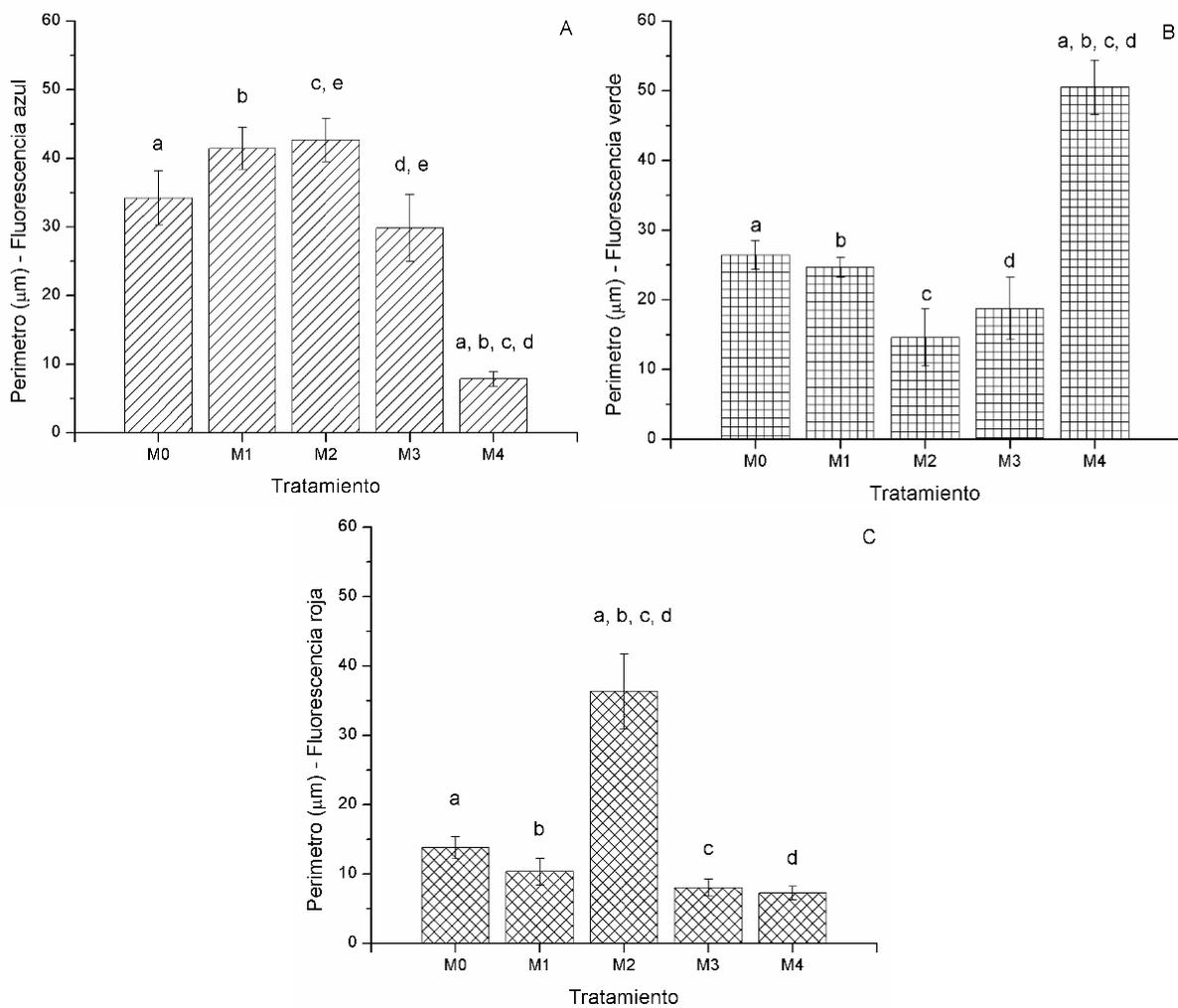


Fig. 15 Perímetro de partículas de fluorescencia azul (A), verde (B) y roja (C), de residuo de agave sin tratamiento (M0) y lignocelulosas después de diferentes tratamientos (M1, M2, M3, M4).

6.5.3 Circularidad de partículas

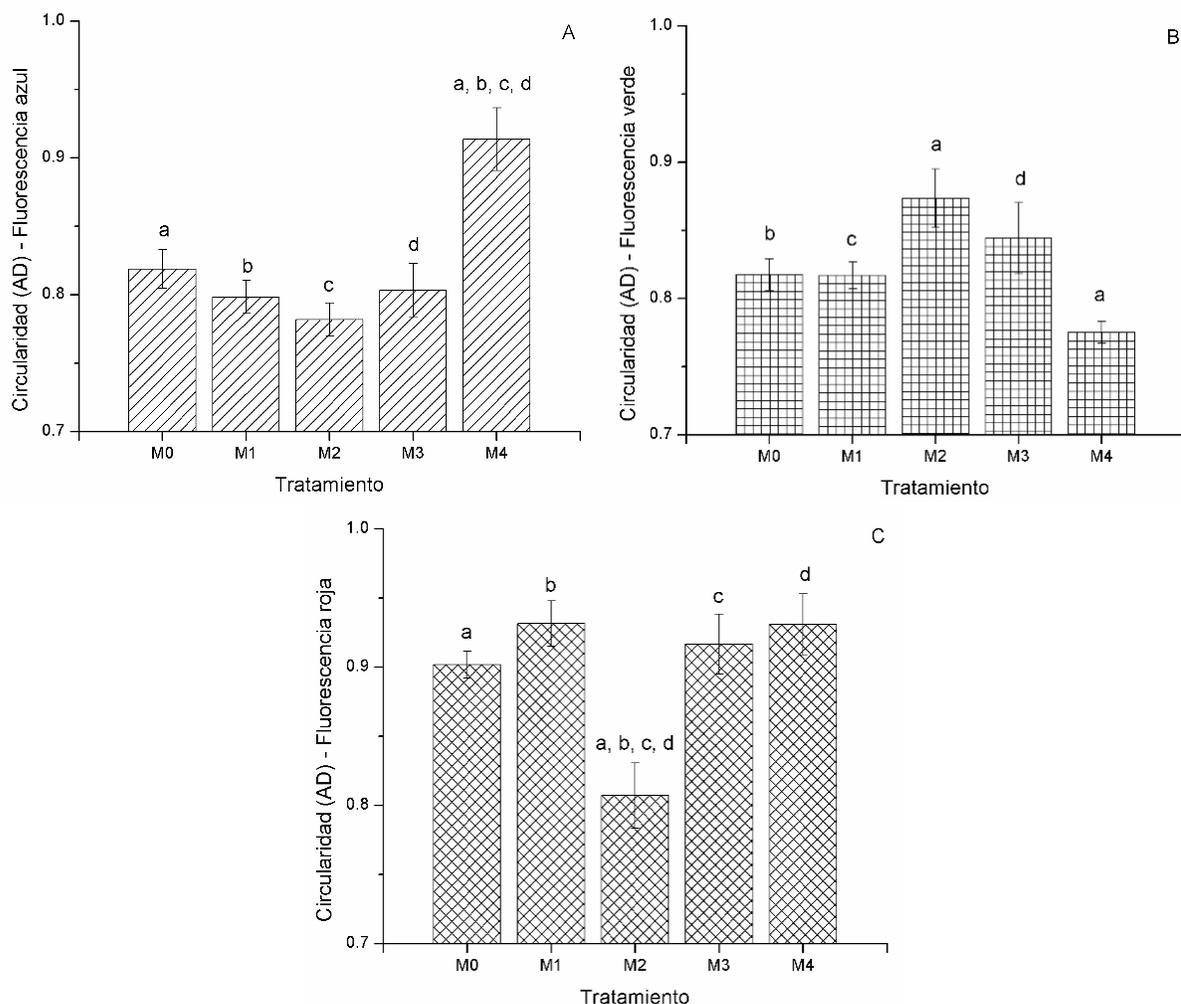


Fig. 16 Circularidad de las partículas de fluorescencia azul (A), verde (B) y roja (C), de residuo de agave sin tratamiento (M0) y lignocelulosas después de diferentes tratamientos (M1, M2, M3, M4).

Para la fluorescencia roja en la muestra M2, se presentó una circularidad baja (0.80) y diferente con los otros tratamientos M0, M1, M3 y M4 (0.90-0.93), al considerar para la misma muestra alta área, alto perímetro y baja circularidad se deduce que la lignina se concentra en M2, y que se desintegra por los tratamientos alcalino y blanqueamiento.

6.5.4 Diámetro de Feret

La circularidad indica que tanta similitud existe a una circunferencia, se representa en un valor de 0-1, siendo 1 una circunferencia perfecta. La fluorescencia azul, correspondiente a lignina, para M4 ha presentado baja área y bajo perímetro esto indica que son partículas pequeñas y ahora con alta circularidad para M4, confirma que se ha desintegrado a través de los tratamientos de tal

manera que forma partículas con una circularidad de 0.91. En cambio, las muestras M0-M3 tienen una circularidad entre 0.79-0.82. En la fluorescencia verde, solo hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos M2 y M4. Baja área y alto perímetro puede indicar que se trata de contornos de partículas grandes y aunado con la baja circularidad (0.77) se puede decir que son de forma irregular.

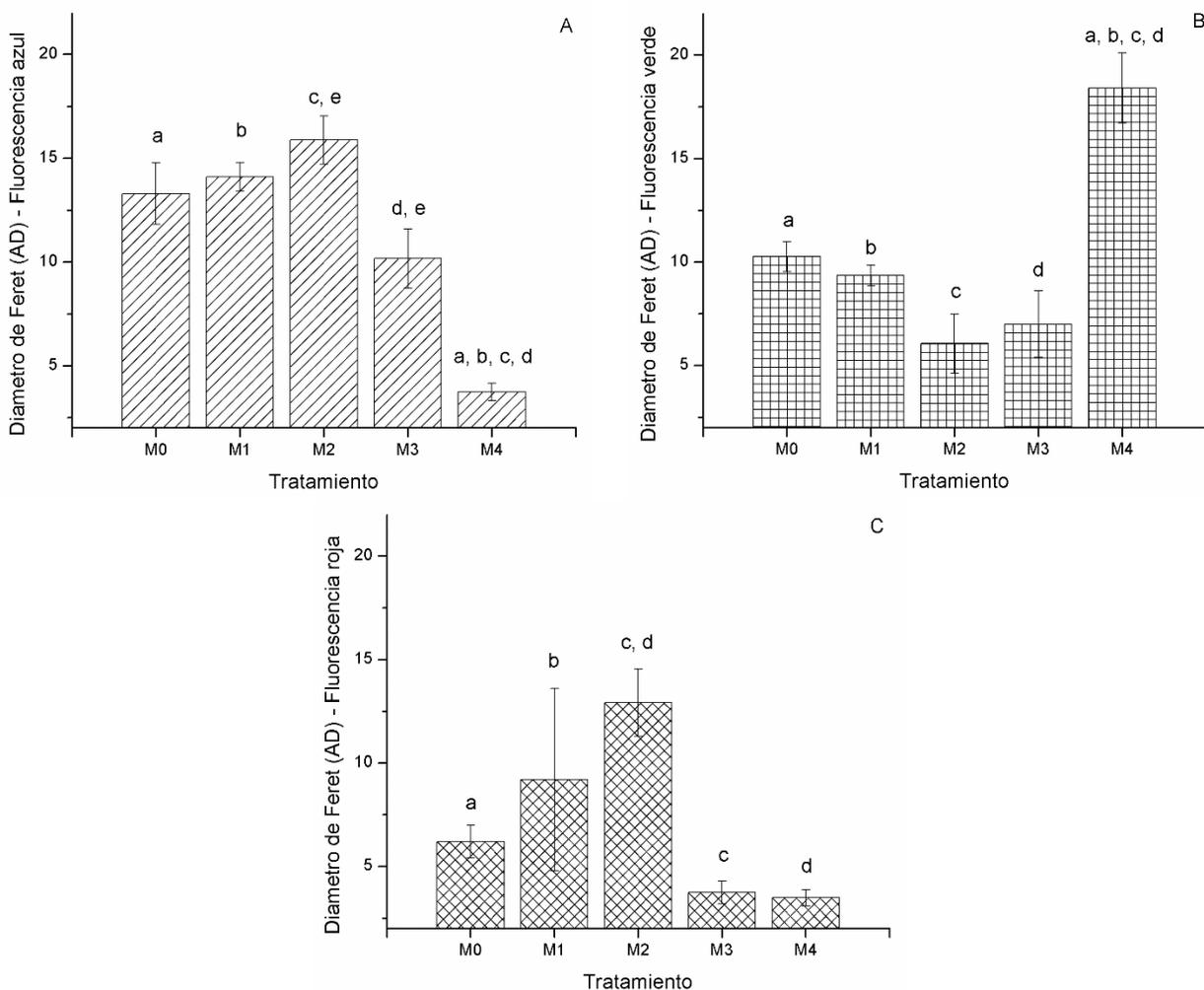


Fig. 17 Diámetro de Feret de las partículas de fluorescencia azul (A), verde (B) y roja (C), de residuo de agave sin tratamiento (M0) y lignocelulosas después de diferentes tratamientos (M1, M2, M3, M4).

El diámetro de Feret representa la distancia más grande entre dos puntos de la frontera seleccionada. Si esta frontera es formada por las partículas producidas por los tratamientos, se aprecia que la M4 tiene dos comportamientos, ambos con diferencia significativa entre M0-M3, bajo diámetro de Feret (< 5) para aquellas que producen autofluorescencia azul, y alto diámetro de

Feret para las que producen fluorescencia verde (>18). Este parámetro se correlaciona directamente con el perímetro de las partículas de fluorescencia azul y verde, aparentemente la fluorescencia azul son partículas pequeñas de alta circularidad y, por el contrario, la fluorescencia verde corresponde a partículas grandes y alargadas. La fluorescencia roja de la lignocelulosa M2 tiene diámetro de Feret estadísticamente diferente con M3 y M4. En ella se tienen partículas grandes de baja circularidad y se aprecia como los tratamientos alcalinos y blanqueamiento disgregan esas sustancias en componentes más pequeños.

6.5.5 Relación de aspecto AR

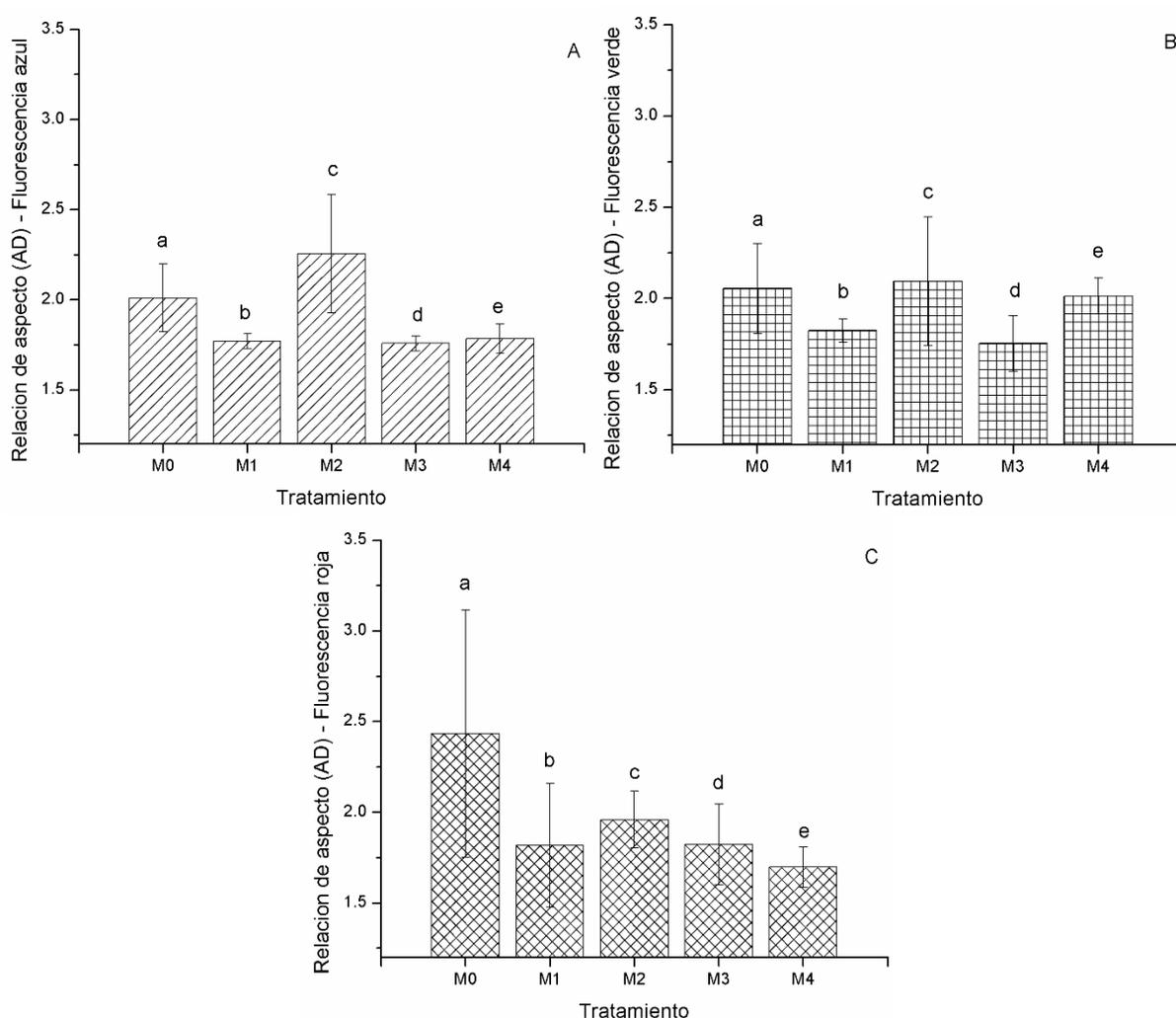


Fig. 18 Relación de aspecto de las partículas de fluorescencia azul (A), verde (B) y roja (C), de residuo de agave sin tratamiento (M0) y lignocelulosas después de diferentes tratamientos (M1, M2, M3, M4).

Si se supone una elipse hipotética para las partículas, no existe una relación coherente entre el eje mayor y el eje menor, con los diferentes tratamientos para los componentes de las tres autofluorescencias. Ninguno de los espectros mostró diferencia significativa entre las diferentes muestras.

6.5.6 Dimensión fractal

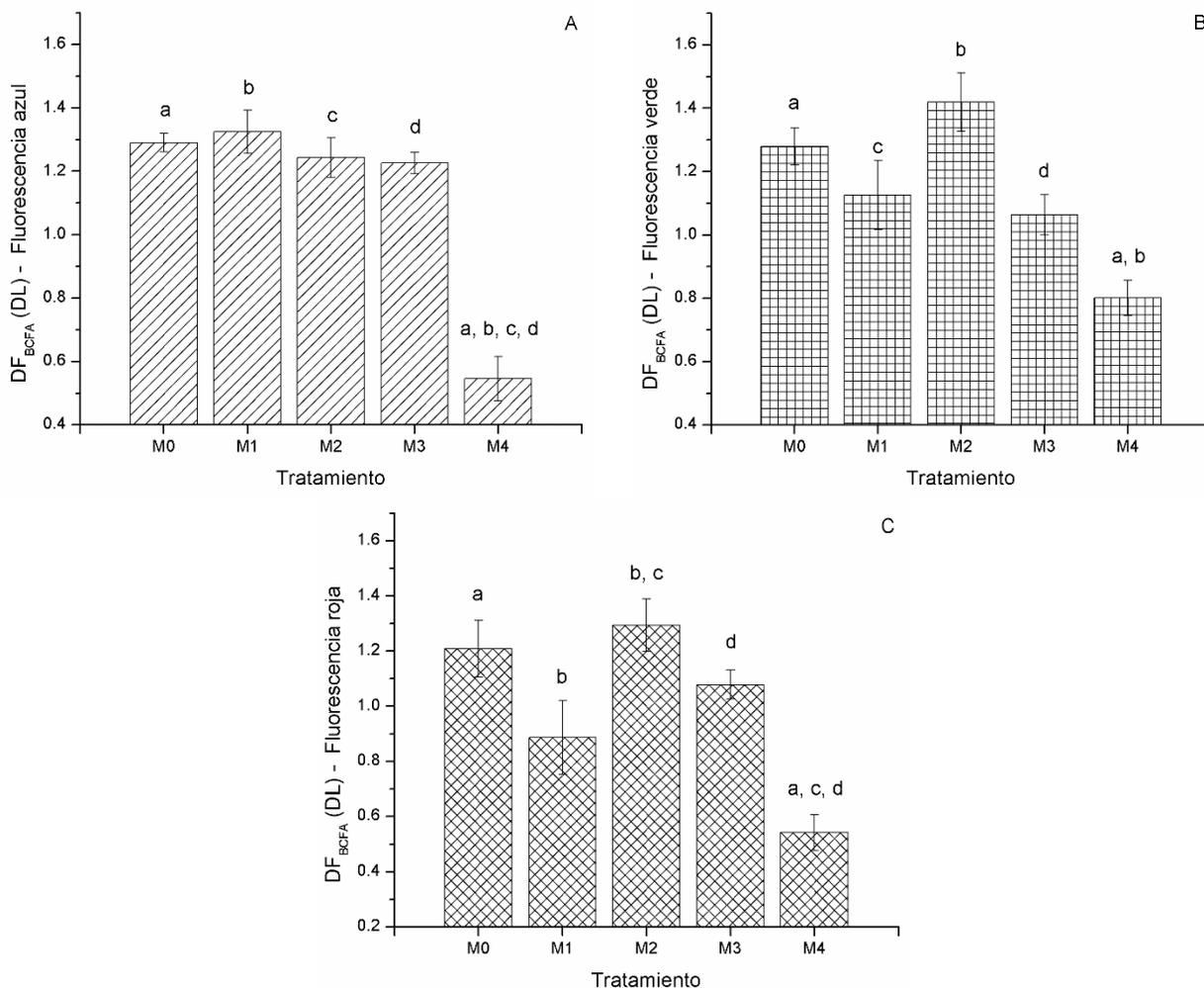


Fig. 19 Dimensión fractal (DF_{BCFA}) de las partículas de fluorescencia azul (A), verde (B) y roja (C), de residuo de agave sin tratamiento (M0) y lignocelulosas después de diferentes tratamientos (M1, M2, M3, M4).

La M4 en el espectro azul mostró una diferencia significativa $p < 0.05$ con un valor de dimensión fractal de 0.5 con respecto a las muestras M0-M3 con valores de alrededor de 1.2. La reducción de este valor significa un cambio en la conformación fractal de la muestra de área a línea. Por otro lado, en el espectro verde solo hay diferencia estadística entre M4 con M0 y M2. De manera similar,

para el espectro rojo la muestra M4 presenta diferencia entre M0, M2 y M3; la muestra M2 presenta diferencia con M1.

6.5.7 Lagunaridad (área)

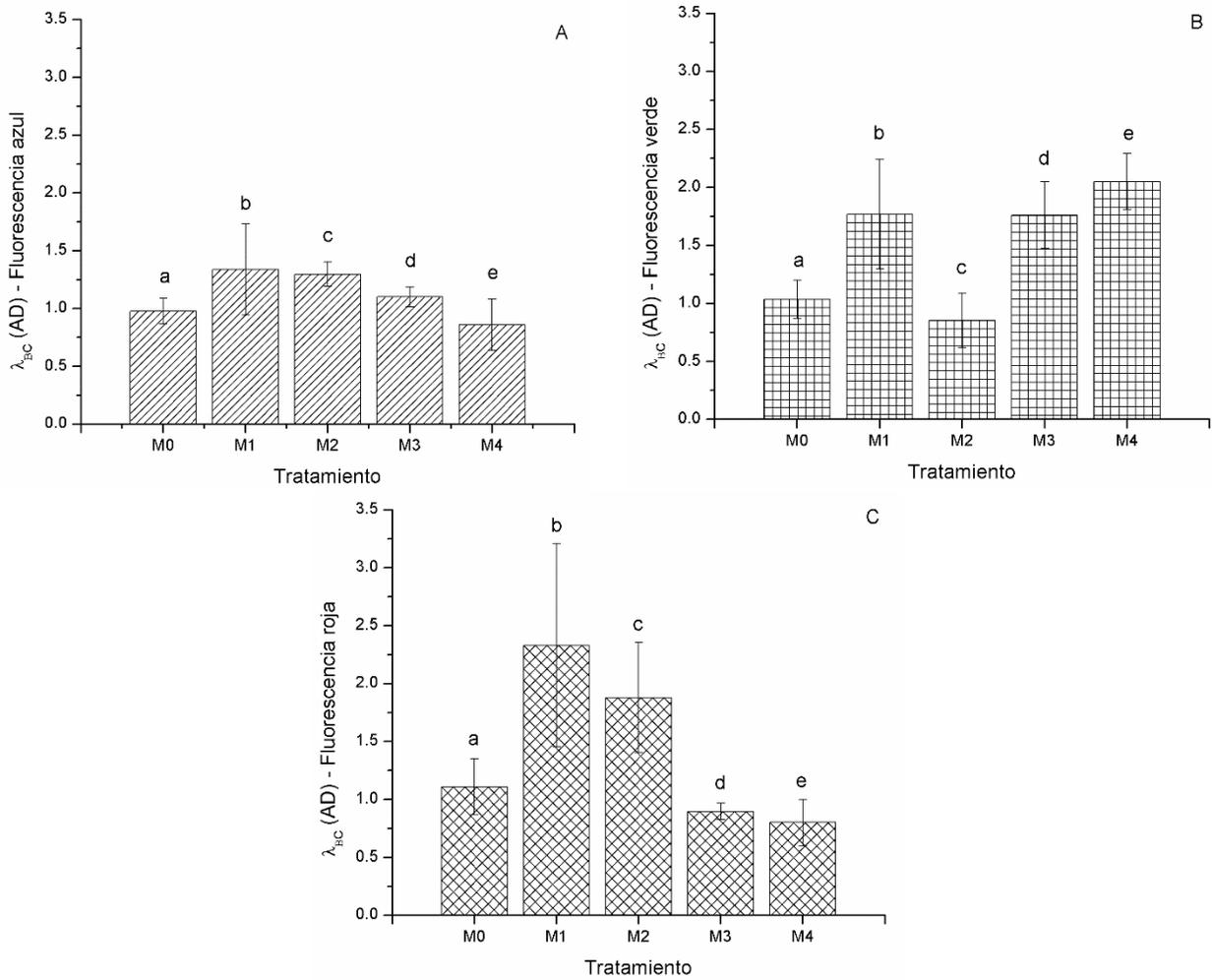


Fig. 20 Lagunaridad de área (λ_{BC}) de las partículas de fluorescencia azul (A), verde (B) y roja (C), de residuo de agave sin tratamiento (M0) y lignocelulosas después de diferentes tratamientos (M1, M2, M3, M4).

6.5.8 Textura (Dimensión fractal y lagunaridad)

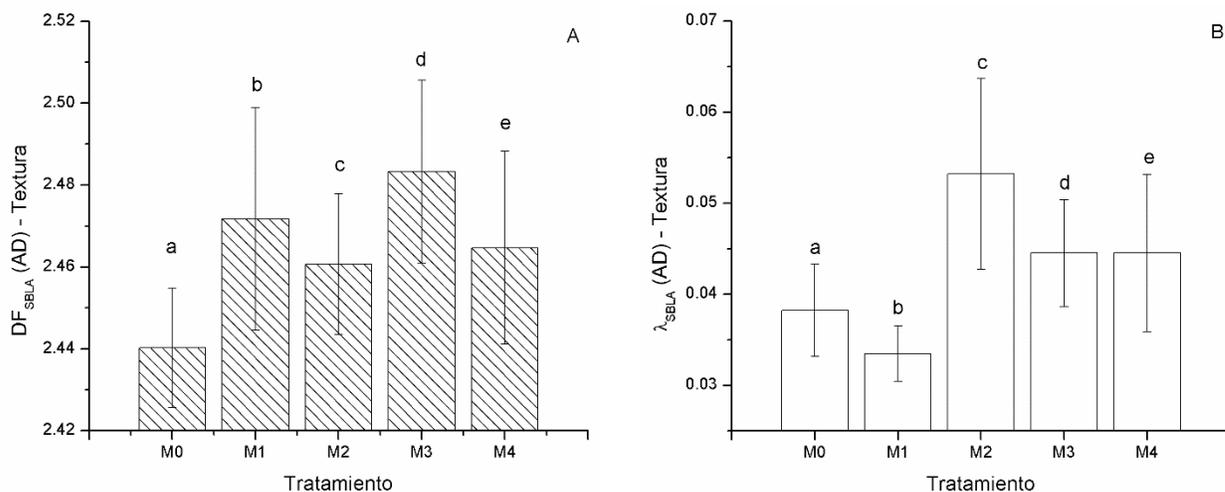


Fig. 21 (A) Dimensión fractal de textura (DF_{SBLA}) y (B) lagunaridad de textura (λ_{SBLA}) de las lignocelulosas sin tratamiento (M0) y por la aplicación de diferentes tratamientos (M1, M2, M3, M4).

La lagunaridad de área y de textura no presenta diferencia significativa entre las muestras.

6.6 Síntesis y análisis de copolímeros

6.6.1 Porcentaje de injerto

El porcentaje de injerto de los productos de la copolimerización con los tres materiales más ricos en material lignocelulósico fueron bajos con relación al obtenido por (A S Singha & Rana 2010), quienes lograron hasta un 40 % de injerto en *A. americana*.

Cuadro 7. Porcentaje de injerto en los copolímeros

Lignocelulosa - Copolímero	Injerto (%)
M2 - MSA	3.72 ± 0.8
M3 - MCA	5.42 ± 1.1
M4 - MBL	4.19 ± 0.9

Existe dificultad en la determinación de estos valores ya que durante la activación de los sitios de reacción por 24 h en medio ligeramente ácido se pueden liberar o hidrolizar algunos componentes que se pierden durante la filtración y hacer que estos valores cambien.

6.6.2 Termogravimetría

En la Fig. 22 se presentan los termogramas correspondientes a los productos de la reacción con MMA y los materiales lignocelulósicos obtenidos con los tratamientos M2, M3 y M4. Se nota en esta figura que el producto más estable es el MCA, que fue producido con la fibra tratada con NaOH al 4 % y el menos estable fue el obtenido con el material lignocelulósico con extracción acuosa, en éste se tiene una pérdida de alrededor del 20 % en una temperatura menor a 100 °C en cambio el más estable presenta solo un 4 % en una temperatura menor a 300 °C similar al producto obtenido con la fibra blanqueada, pero en el que la pérdida es casi del 13 %. La mayor pérdida de masa se da entre 300 y 350 °C en la que se pierde entre 60 y 70 %.

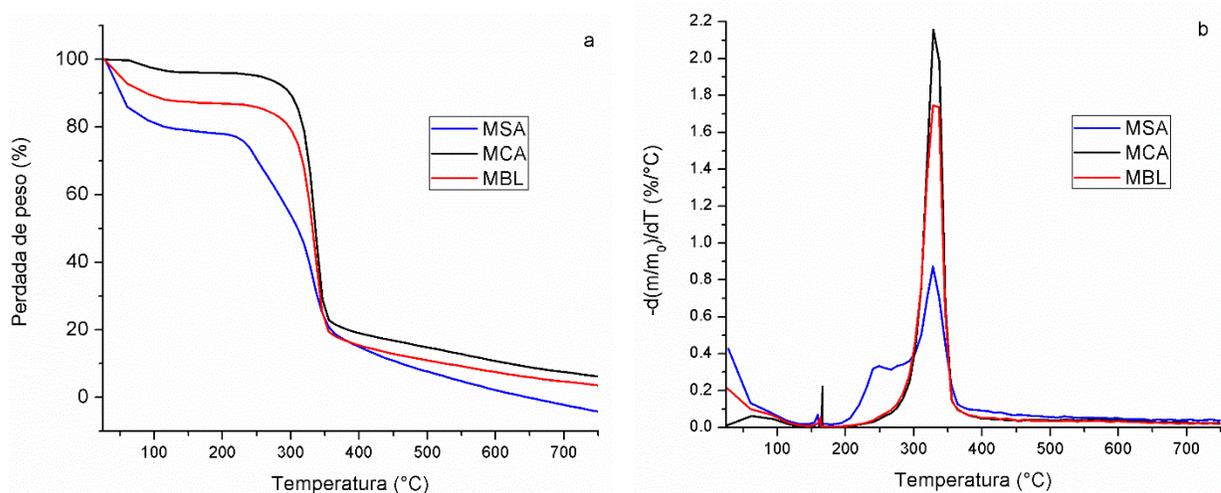


Fig. 22 Estabilidad térmica de los copolímeros usando lignocelulosa proveniente de *A. salmiana*. (a) Curvas termogravimétricas y (b) espectro termogravimétrico diferencial. MSA (copolímero con lignocelulosa M2), MCA (copolímero con lignocelulosa M3) y MBL (copolímero con lignocelulosa M3).

6.6.3 Microscopia confocal de copolímeros

Con esta técnica se apreciaron los diferentes componentes por autofluorescencia de los mismos. La lignina y la celulosa fueron los que se percibieron mejor, se puede apreciar cómo se encuentran inmersos. También se aprecia el material copolimerizado con las fibras. En el que se puede ver con más claridad es en la MCA. En los recuadros de la imagen 1 se presentan la autofluorescencia de los materiales lignocelulósicos.

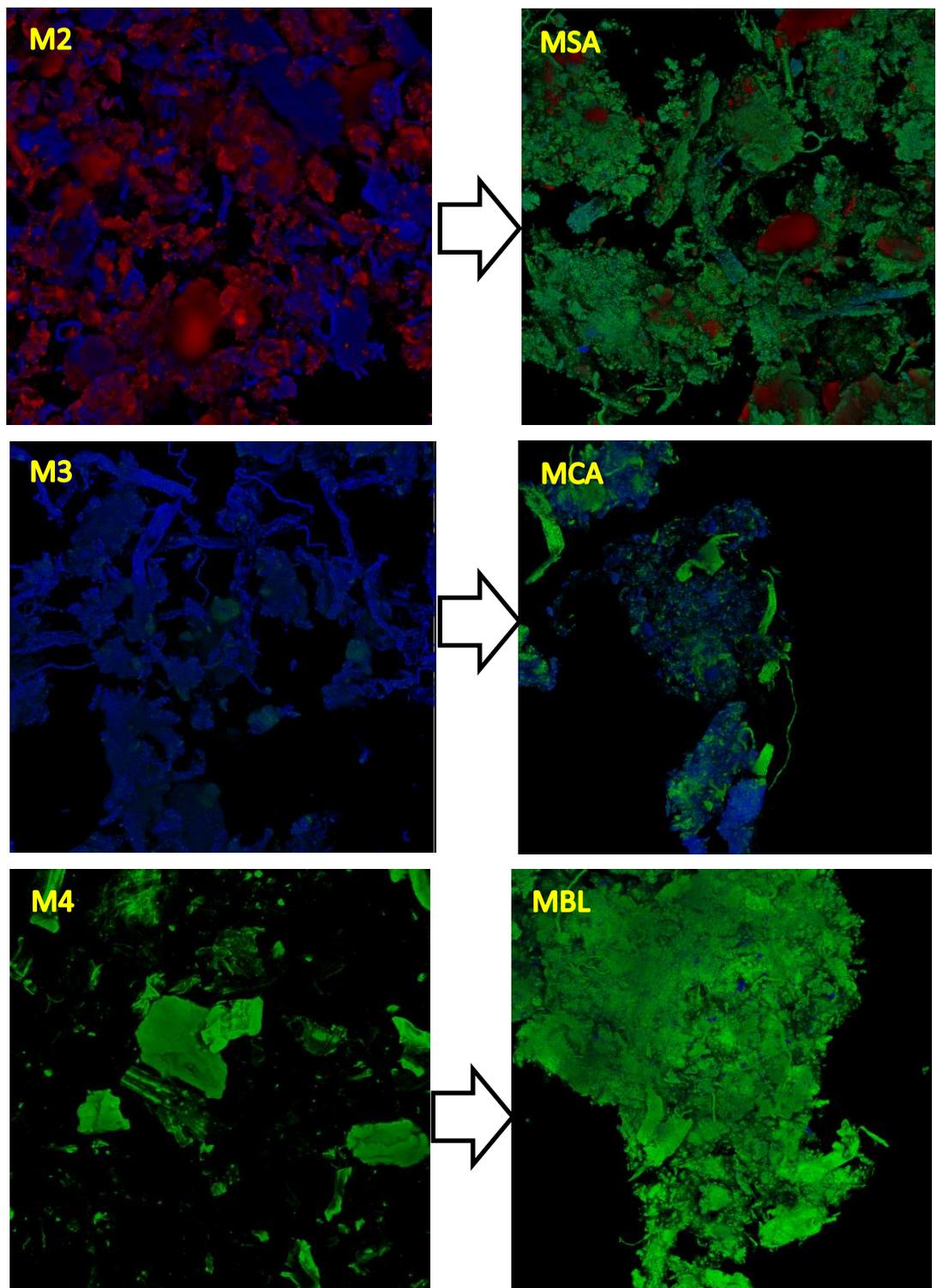


Fig. 23 Microscopia confocal (20X) de los materiales lignocelulósicos (M2, M3 y M4) y material copolimerizado correspondiente (MSA, MCA y MBL)

6.6.4 Microscopia MEB-AR

Se aprecian los cambios en la disgregación de los componentes del material lignocelulósico. El material con blanqueamiento es el que se aprecia más separado. Se ve que, aunque se eliminan las otras fibras siguen estando las fibras familiares de celulosa. También se nota que el material que se forma con la M3, tiene en su superficie algunas zonas con formación de copolímero.

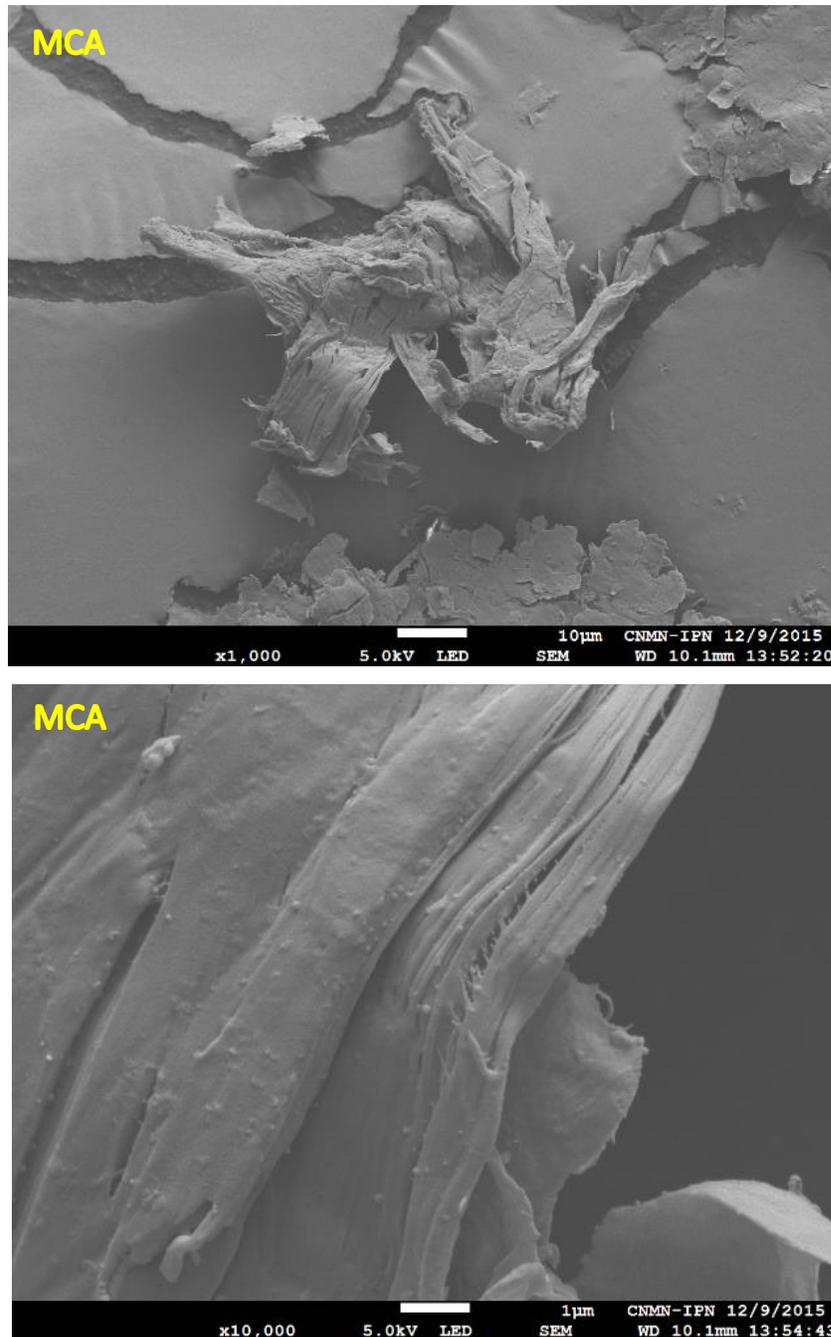


Fig. 24. Micrografía MEB-AR del copolímero MCA (usando lignocelulosa M3)

6. CONCLUSIONES

1. Derivado del análisis de la composición de las pencas residuales de *A. salmiana*, se identificó además de celulosa, una concentración valiosa de glucosa y fructosa susceptible de ser debidamente aprovechable. Ya que se recuperan con facilidad por extracciones acuosas.
2. Mediante los tratamientos de desintegración empleados para enriquecer la concentración de celulosa se identificó que la extracción acuosa genera el mejor rendimiento, seguido del tratamiento alcalino, alcanzando 53 y 76 % de celulosa, respectivamente. Al neutralizar el extracto alcalino, se pueden recuperar algunas hemicelulosas precipitándolas con etanol.
3. Los análisis generados por Espectroscopia de IR, Termo gravimetría, Difracción de rayos X y Microscopia Confocal y de Barrido de Electrones, dan cuenta del incremento en la celulosa al aplicar la extracción etérea, extracción acuosa, tratamiento alcalino y blanqueamiento.
4. Las características de los materiales lignocelulosicos obtenidos con los tratamientos en el nivel de extracción acuosa, tratamiento alcalino y blanqueamiento son susceptibles de ser utilizados en la copolimerización con algún monómero vinílico, debido al bajo índice de cristalinidad y alta desintegración del material que se apreció por DRX y microscopia SEM.
5. El material engrapado necesita ser optimizado considerando tanto condiciones de reacción, como de tamaño de partícula y en especial tratamientos que reduzcan la cristalinidad para mejorar la disponibilidad de los sitios de reacción.

Nomenclatura

I.C. Índice de cristalinidad

I_c Intensidad de la fracción cristalina (22 – 23 °)

I_a Intensidad de la fracción amorfa (18 – 19 °).

ΔE^* Diferencia de color entre tratamientos

CI Índice de color

C* Intensidad de color

H* Ángulo de color

L* Luminosidad de 0-100

a*Componente cromático entre verde y rojo

b*Componente cromático entre azul y amarillo

Bibliografía

- Abraham, E. et al., 2011. Extraction of nanocellulose fibrils from lignocellulosic fibres: A novel approach. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), pp.1468–1475. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.034>.
- Acosta-Montoya, Ó. et al., 2010. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry*, 119(4), pp.1497–1501. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.032>.
- Alemdar, A. & Sain, M., 2008. Biocomposites from wheat straw nanofibers: Morphology, thermal and mechanical properties. *Composites Science and Technology*, 68(2), pp.557–565.
- Apolinário, A.C. et al., 2014. Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), pp.368–378.
- Arrizon, J. et al., 2010. Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of Agave tequilana plants of different ages. *Food Chemistry*, 122 (1), pp.123–130. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.028>.
- Bajpai, P., 2012. *5 - Hydrogen Peroxide Bleaching* 2nd ed., Elsevier B.V. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59421-1.00005-3>.
- Bartra, A. et al., 2012. Licor de las verdes matas. *La jornada del campo*, p.20.
- Basurto-Ortíz, R.I. et al., 2008. Analysis of the Main Components of the Aguamiel Produced by the Maguey-Pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the Harvest Period. *J. Agric. food chem*, 56, pp.3682–3687.
- Bessadok, A. et al., 2008. Influence of chemical modifications on water-sorption and mechanical properties of Agave fibres. *Composites. Part A: applied science and manufacturing*, 39, pp.29–45.
- Bhatnagar, A. & Sain, M., 2005. Processing of Cellulose Nanofiber-reinforced Composites. *Journal of Reinforced Plastics and Composites*, 24(12), pp.1259–1268.
- Brinchi, L. et al., 2013. Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass : Technology and applications. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), pp.154–169. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.033>.
- Carrier, M. et al., 2011. Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. *Biomass and Bioenergy*, 35(1), pp.298–307. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953410003314>.

- Cesa, S. et al., 2017. Evaluation of processing effects on anthocyanin content and colour modifications of blueberry (*Vaccinium* spp.) extracts: Comparison between HPLC-DAD and CIELAB analyses. *Food Chemistry*, 232, pp.114–123.
- Donaldson, L., 2013. Softwood and hardwood lignin fluorescence spectra of wood cell walls in different mounting media. *IWA Journal*, 34(1), pp.3–19.
- Elanthikkal, S. et al., 2010. Cellulose microfibrils produced from banana plant wastes: Isolation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), pp.852–859.
- FitzPatrick, M. et al., 2010. A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource Technology*, 101(23), pp.8915–8922. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.125>.
- Flores Morales, A. et al., 2009. Mecanismos de conservación y uso del maguey pulquero *Agave salmiana* en el altiplano Mexicano. *Somas (Sociedad Mexicana de Agricultura Sostenible)*, 6, pp.1–10.
- Gutiérrez, A., Rodríguez, I.M. & Río, J.C., 2008. Chemical composition of lipophilic extractives from sisal (*Agave sisalana*) fibers. *Industrial Crops and Products*, 8, pp.81–87.
- Habibi, Y., Lucia, L.A. & Rojas, O.J., 2010. Cellulose Nanocrystals : Chemistry, Self-Assembly, and Applications. *Chemical reviews*, 110, pp.3479–3500.
- Hamissa, A.M.B. et al., 2010. Sorption of Cd(II) and Pb(II) from aqueous solutions onto *Agave americana* fibers. *Chemical Engineering Journal*, 159(1–3), pp.67–74.
- Idarraga, G. et al., 1999. Pulp and paper from blue agave waste from tequila production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), pp.4450–4455.
- Johansson, C. et al., 2012. Packaging Applications – A Review of Recent Developments. *Bioresources*, 7(2), pp.1–47.
- Johar, N., Ahmad, I. & Dufresne, A., 2012. Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. *Industrial Crops and Products*, 37(1), pp.93–99. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.016>.
- John, M.J. & Thomas, S., 2008. Biofibres and biocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 71(3), pp.343–364.
- José, J.R. & García, M.E., 2000. Boletín de la Sociedad Botánica de México. *Remoción cuticular (“Mixiote”) y desarrollo foliar en los agaves pulqueros (Agave salmiana A. mapisaga)*, pp.73–79.
- Kaushik, A., Singh, M. & Verma, G., 2010. Green nanocomposites based on thermoplastic starch and steam exploded cellulose nanofibrils from wheat straw. *Carbohydrate Polymers*, 82(2),

pp.337–345. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.063>.

Khalil, H.P.S.A. et al., 2001. Effect of acetylation on interfacial shear strength between plant fibres and various matrices. *European Polymer Journal*, 37(5), pp.1037–1045.

Khalil, H.P.S.A., Bhat, A.H. & Yusra, A.F.I., 2012. Green composites from sustainable cellulose nanofibrils : A review. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), pp.963–979. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.078>.

Kim, J.T. & Netravali, A.N., 2010. Mercerization of sisal fibers: Effect of tension on mechanical properties of sisal fiber and fiber-reinforced composites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 41(9), pp.1245–1252. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.compositesa.2010.05.007>.

Lavoine, N. et al., 2012. Microfibrillated cellulose - Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate Polymers*, 90(2), pp.735–764. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.026>.

Linton, M.J. & Nobel, P.S., 2001. Hydraulic conductivity, xylem cavitation, and water potential for succulent leaves of agave deserti and agave tequilana. *Int. J. Plant Sci*, 162(4), pp.747–754.

Loureiro, P.E.G., Evtuguin, D. V & Carvalho, M.G.V.S., 2011. The final bleaching of eucalypt kraft pulps with hydrogen peroxide: Relationship with industrial ECF bleaching history and cellulose degradation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86(3), pp.381–390.

Luo, J. et al., 2011. Lignin recovered from the near-neutral hemicellulose extraction process as a precursor for carbon fiber. *BioResources*, 6(4), pp.4566–4593.

Marques, G., del Río, J.C. & Gutiérrez, A., 2010. Lipophilic extractives from several nonwoody lignocellulosic crops (flax, hemp, sisal, abaca) and their fate during alkaline pulping and TCF/ECF bleaching. *Bioresource Technology*, 101(1), pp.260–267. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.036>.

Marszałek, K., Mitek, M. & Skąpska, S., 2015. Effect of Continuous Flow Microwave and Conventional Heating on the Bioactive Compounds, Colour, Enzymes Activity, Microbial and Sensory Quality of Strawberry Purée. *Food and Bioprocess Technology*, 8(9), pp.1864–1876.

Moon, R.J. et al., 2011. *Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites*, Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21566801>.

Msahli, S., Sakli, F. & Drean, J.Y., 2006. Study of textile potential of fibres extracted from Tunisian agave Americana L. *Autex Research Journal*, 6(1), pp.9–13.

- Mwaikambo, L.Y. & Ansell, M.P., 2002. Chemical modification of hemp, sisal, jute, and kapok fibers by alkalization. *Journal of Applied Polymer Science*, 84(12), pp.2222–2234.
- Mylsamy, K. & Rajendran, I., 2011. The mechanical properties, deformation and thermomechanical properties of alkali treated and untreated Agave continuous fibre reinforced epoxy composites. *Materials and Design*, 32(5), pp.3076–3084.
- Nacos, M.K. et al., 2006. Kenaf xylan - A source of biologically active acidic oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 66(1), pp.126–134.
- Ouajai, S. & Shanks, R.A., 2005. Morphology and structure of hemp fibre after bioscouring. *Macromolecular Bioscience*, 5(2), pp.124–134.
- Peng, F. et al., 2012. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology Advances*, 30(4), pp.879–903.
- Pinos-Rodríguez, J., Zamudio, M. & González, S., 2008. The effect of plant age on the chemical composition of fresh and ensiled *Agave salmiana* leaves. *South African Journal of Animal Science*, 38(1), pp.43–50. Available at: <http://www.ajol.info/index.php/sajas/article/view/4108>.
- Praznik, W. et al., 2013. Structure of fructo-oligosaccharides from leaves and stem of Agave tequilana Weber, var. azul. *Carbohydrate Research*, 381, pp.64–73. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2013.08.025>.
- Qin, C. et al., 2008. The effect of fibre volume fraction and mercerization on the properties of all-cellulose composites. *Carbohydrate Polymers*, 71(3), pp.458–467.
- Rodrigo, D., van Loey, A. & Hendrickx, M., 2007. Combined thermal and high pressure colour degradation of tomato puree and strawberry juice. *Journal of Food Engineering*, 79(2), pp.553–560.
- Roshchina, V. V., 2012. Vital Autofluorescence: Application to the Study of Plant Living Cells. *International Journal of Spectroscopy*, 2012, pp.1–14. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/ij/s/2012/124672/>.
- Rosli, N.A., Ahmad, I. & Abdullah, I., 2013. Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from agave angustifolia fibre. *BioResources*, 8(2), pp.1893–1908.
- SAGARPA, 2013. *Proyecto regional 2013 de tecnologías de producción, transformación, y comercialización del agave pulquero para los estados de Hidalgo, Tlaxcala y Puebla.*, Hidalgo.
- Sain, M. & Panthapulakkal, S., 2006. Bioprocess preparation of wheat straw fibers and their characterization. *Industrial Crops and Products*, 23(1), pp.1–8.

- Santos-Zea, L. et al., 2012. Agave (*Agave* spp.) and its Traditional Products as a Source of Bioactive Compounds. *Current Bioactive Compounds*, 8(3), pp.218–231.
- Santos, J.D.G. et al., 2013. Aqueous extraction of pectin from sisal waste. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), pp.1997–2001. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.089>.
- Schalek, R. et al., 2005. Characterization of Electron Beam Irradiated and Alkali Treated Henequen (*Agave Fourcroyodes*) Fibers Using SEM, TEM, EDS and CP/MAS C13 NMR. *Microscopy and Microanalysis*, 11(S02), pp.1740–1741. Available at: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1431927605505427.
- Ben Sghaier, A.E.O. et al., 2012. Morphological and crystalline characterization of NaOH and NaOCl treated *Agave americana* L. fiber. *Industrial Crops and Products*, 36(1), pp.257–266.
- Singh, J., Suhag, M. & Dhaka, A., 2015. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. *Carbohydrate Polymers*, 117, pp.624–631. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.012>.
- Singha, A.S. & Rana, R.K., 2010. Enhancement of hydrophobic character of lignocellulosic fibers through graft-copolymerization. *Advanced Materials Letters*, 1(2), pp.156–163.
- Singha, A.S. & Rana, R.K., 2010. Graft Copolymerization of Methyl Methacrylate (MMA) onto *Agave americana* Fibers and Evaluation of their Physicochemical Properties. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 15(918398377), p.27–42 ST–Graft Copolymerization of Methyl Metha.
- Stephens, J. & Halpin, C., 2007. Lignin manipulation for fibre improvement. *Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses*, pp.129–153.
- Sun, R., Fang, J.M. & Tomkinson, J., 2000. Characterization and esterification of hemicelluloses from rye straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), pp.1247–1252.
- Sun, X.F. et al., 2005. Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw. *Carbohydrate Research*, 340(1), pp.97–106.
- Thamae, T. & Baillie, C., 2007. Influence of fibre extraction method, alkali and silane treatment on the interface of *Agave americana* waste HDPE composites as possible roof ceilings in Lesotho. *Composite Interfaces*, 14(7–9), pp.821–836.
- Ting, S., 1956. Rapid colorimetric method for simultaneous determination of total reducing sugars and Fructose in citrus juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4(3), pp.263–266.
- Toledano-Thompson, T., Loría-Bastarrachea, M.I. & Aguilar-Vega, M.J., 2005. Characterization

of henequen cellulose microfibers treated with an epoxide and grafted with poly(acrylic acid). *Carbohydrate Polymers*, 62(1), pp.67–73.

Tovar-Carrillo, K.L. et al., 2014. Effects of sodium hypochlorite on Agave tequilana Weber bagasse fibers used to elaborate cyto and biocompatible hydrogel films. *Materials Science and Engineering C*, 42, pp.808–815.

Le Troedec, M. et al., 2008. Influence of various chemical treatments on the composition and structure of hemp fibres. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 39(3), pp.514–522.

Tronc, E. et al., 2007. Blue agave fiber esterification for the reinforcement of thermoplastic composites. *Carbohydrate Polymers*, 67(2), pp.245–255.

Uetani, K. & Yano, H., 2011. Nanofibrillation of wood pulp using a high- speed blender. *Biomacromolecules*, 12(2), pp.348–353.

Velazquez-Jimenez, L.H., Pavlick, A. & Rangel-Mendez, J.R., 2013. Chemical characterization of raw and treated agave bagasse and its potential as adsorbent of metal cations from water. *Industrial Crops and Products*, 43(1), pp.200–206. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.049>.

Xie, Y. et al., 2010. Silane coupling agents used for natural fiber/polymer composites: A review. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 41(7), pp.806–819. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.compositesa.2010.03.005>.

Zhang, W., Okubayashi, S. & Bechtold, T., 2005. Fibrillation tendency of cellulosic fibers - Part 4. Effects of alkali pretreatment of various cellulosic fibers. *Carbohydrate Polymers*, 61(4), pp.427–433.

Referencias de internet:

FAO. 2014. *Soluciones apropiadas para el envasado de alimentos en los países en desarrollo*. Roma.

Packaging Gateway, Mayo 2010. Scientists Develop Most Flexible Edible Food Packaging Yet. <http://www.packaging-gateway.com/news/news85491.html>

Packaging Gateway, Mayo 2010. Plastic Bags Developed from Fruit Waste. <http://www.packaging-gateway.com/news/news86075.html>

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera – SIAP Consultado Enero 2016