



## Disintegration treatments of *Agave Salmiana* waste: Lignocellulose characterization by physicochemical, thermogravimetric and spectroscopic studies

### Tratamientos de desintegración de desechos de *Agave Salmiana*: Caracterización de la lignocelulosa por estudios físicoquímicos, termogravimétricos y espectroscópicos

Chávez-Romero, R.<sup>1</sup>, Flores-Morales, A.<sup>2</sup>, Yee-Madeira, H. T.<sup>3</sup>,  
García-Zebadúa, J. C.<sup>1</sup>, González-Montoya, M.<sup>1</sup>, Mora-Escobedo, R.<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Adolfo López Mateos. Wilfrido Massieu 399, Del. Gustavo A. Madero, Col. Nueva Industrial Vallejo. C.P. 07738. Ciudad de México.

<sup>2</sup>Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala (ITAT). Carretera Federal San Martín Texmelucan – Tlaxcala, Km 7.5, San Diego Xocoyucan C.P. 90122, Tlaxcala, México.

<sup>3</sup>Escuela Superior de Física y Matemáticas, Instituto Politécnico Nacional. Av. Instituto Politécnico Nacional S/N, San Pedro Zacatenco, C.P. 07738, Ciudad de México.

**Cite this paper/Como citar este artículo:** Chávez-Romero, R., Flores-Morales, A., Yee-Madeira, H. T., García-Zebadúa, J. C., González-Montoya, M., Mora-Escobedo, R. (2018). Disintegration treatments of *Agave Salmiana* waste: Lignocellulose characterization by physicochemical, thermogravimetric and spectroscopic studies. *Revista Bio Ciencias*, 5, e500. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.05.e500>



#### ABSTRACT

The bio waste of agave sap production such as leaves of *Agave salmiana* are rich in carbohydrates, so this material can be recycled to obtain components that can be used in different industries and bioenergy sectors. Physicochemical disintegration methods provide the possibility to recover these products. The aim of this work was to study the influence of a sequence of physicochemical treatments on the disintegration of *A. salmiana* leaves after sap extraction to obtain lignocellulose. The agave leaves were pulverized (M0), treated with Petroleum ether (M1), water (M2), alkaline solution (M3), Sodium chlorite and Hydrogen peroxide (M4). It was determined the chemical composition of M0 and neutral detergent fiber (M0-M4). Lignocellulose was analyzed using Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray diffraction (XRD), and

#### Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: April 27<sup>th</sup> 2018. .

Accepted/Aceptado: June 28<sup>th</sup> 2018.

Available on line/Publicado: November 29<sup>th</sup> 2018.

#### RESUMEN

Los residuos biológicos de la producción de aguamiel como las hojas de *Agave salmiana*, son ricos en carbohidratos. Estos materiales pueden ser reciclados para obtener componentes para diferentes industrias y sectores bioenergéticos. Una separación completa de cada componente por métodos de desintegración fisicoquímica brinda la posibilidad de recuperar bioproductos. El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de una secuencia de tratamientos fisicoquímicos sobre la desintegración de hojas de *A. salmiana* después de la extracción de savia para obtener lignocelulosa. Las hojas de agave se pulverizaron (M0), se trataron con éter de petróleo (M1), agua (M2), solución alcalina (M3), clorito de sodio y peróxido de hidrógeno (M4). Se determinó la composición química de M0 y fibra detergente neutro (M0-M4). La lignocelulosa se analizó mediante espectroscopía infrarroja con Fourier (FT-IR), difracción de rayos X (XRD) y análisis termogravimétrico (TGA). Estos tratamientos llevaron al enriquecimiento de celulosa (18.67-78.88 %), mientras que la cristalinidad más alta se alcanzó con la hidrólisis alcalina (65.66 %). Se encontró a través de

#### \*Corresponding Author:

Mora-Escobedo, R. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Adolfo López Mateos. Wilfrido Massieu 399, Del. Gustavo A. Madero, Col. Nueva Industrial Vallejo. C.P. 07738. Ciudad de México. E-mail: [rosalmorae@gmail.com](mailto:rosalmorae@gmail.com).

thermogravimetric analysis (TGA). These treatments led to cellulose enrichment (18.67–78.88 %), while the highest crystallinity was reached with alkaline hydrolysis (65.66 %). Bleaching reduced crystallinity (48.73 %) and the signal reduction of the C=O and C=C aromatic bonds of lignin was found through FT-IR. Using TGA, it was proved the elimination of carbohydrates and the fractionation of lignin, as well as a greater thermal stability of the lignocellulose M3 (340 °C). A high crystallinity and thermal stability of lignocellulose M4 is wished to obtain better biomaterials. Finally, bleaching increased the amorphous cellulose which can be used for the production of biofuels or grafting materials. These results provide an alternative and a possible innovative way to get advantage of Agave wastes in benefit of agro-industry.

---

### KEY WORDS

---

*A. salmiana* leaves, biowaste, lignocellulose, physicochemical disintegration.

---

### Introduction

*Agave salmiana* is grown for “aguamiel” (agave sap) production. The agave plant reaches maturity at 12–16 years, weighing up to 1,200 kg and having a short productive life (5 months), which it generates from 2,550 to 2,850 L of natural sap. Afterwards, the agave plant becomes waste which is occasionally used in handicrafts, fuel and organic material as fertilizer (SAGARPA, 2013). From the different agave species the following have been recovered: pectin (Santos *et al.*, 2013), lipophilic extracts (Marques *et al.*, 2010), fructo-oligosaccharides (Praznik *et al.*, 2013), inulin (Apolinário *et al.*, 2014; Chi *et al.*, 2011), saponins (Cheok *et al.*, 2014), D-mannitol (Branco *et al.*, 2010) and biofibers as hemicellulose (Peng *et al.*, 2012), lignin (Sifontes & Domine, 2013) and cellulose (Rosli *et al.*, 2013).

The biowaste of aguamiel production such as leaves of *A. salmiana* are studied due to their chemical composition rich in carbohydrates (monomers and polymers). Currently, investigations for developing new biomaterials and obtaining biofuel are focus on taking advantage of agro-industrial wastes as a biomass source.

However, due to the integration of the components and the differences between their properties, a complete

la espectroscopía infrarroja que el blanqueamiento redujo la cristalinidad (48.73 %) y la reducción de la señal de los enlaces aromáticos C=O y C=C de la lignina. Usando el análisis termogravimétrico, se demostró la eliminación de carbohidratos y el fraccionamiento de la lignina, así como una mayor estabilidad térmica de la lignocelulosa M3 (340 °C). Una alta cristalinidad y estabilidad térmica de lignocelulosa M4 es deseable para obtener mejores biomateriales. Finalmente, el blanqueo aumentó la celulosa amorfa, que puede ser utilizada para producir biocombustibles o materiales de injerto. Estos resultados proporcionan una alternativa y una posible forma innovadora de aprovechar los desechos de Agave en beneficio de la agroindustria.

---

### PALABRAS CLAVE

---

Hojas de *A. salmiana*, residuos biológicos, lignocelulosa, desintegración fisicoquímica.

---

### Introducción

El *Agave salmiana* se cultiva para la producción de aguamiel (la savia del agave). Después de esto, la planta de agave se convierte en residuo que es ocasionalmente usado en artesanías, combustible, y materia orgánica como fertilizante (SAGARPA, 2013). Se ha recuperado de diferentes especies de agave: pectina (Santos *et al.*, 2013), extractos lipofílicos (Marques *et al.*, 2010), fructooligosacáridos (Praznik *et al.*, 2013), inulina (Apolinário *et al.*, 2014; Chi *et al.*, 2011), saponinas (Cheok *et al.*, 2014), D-manitol (Branco *et al.*, 2010) y biofibras como hemicelulosas (Peng *et al.*, 2012), lignina (Sifontes & Domine, 2013) y celulosa (Rosli *et al.*, 2013).

Los residuos derivados de la producción de aguamiel como las hojas de *Agave salmiana*, se están estudiando debido a su composición química rica en carbohidratos (monómeros y polímeros). Actualmente, las investigaciones para desarrollar nuevos biomateriales y obtener biocombustibles están dirigidas para aprovechar residuos agroindustriales como fuente de biomasa.

Sin embargo, debido a la interacción de los componentes y a las diferencias entre sus propiedades, es un desafío la separación pura y completa de cada componente del agave. Algunos trabajos se han enfocado en obtener el componente más abundante: celulosa (Johar *et al.*, 2012; Rosli *et al.*, 2013). Aunque la extracción de celulosa es más fácil de fuentes no maderables, la madera ha sido la principal fuente de celulosa.

and pure separation of each component of agave is a challenge. Some works focus on obtaining the most abundant component: cellulose (Johar *et al.*, 2012; Rosli *et al.*, 2013). Although cellulose extraction is easier in non-wood sources, wood has been the main source of cellulose. Physicochemical disintegration methods are favorable to produce cellulose, while providing the possibility to recover byproducts that may be of interest to chemical, pharmaceutical, food industries and bioenergy sectors.

The properties of lignocellulosic biomass have been studied in different types of source such as rice husk (Johar *et al.*, 2012), banana plant waste (Elanthikkal *et al.*, 2010), wheat straw (Sun *et al.*, 2005), cashew apple bagasse and seaweed bagasse (Avendaño-Morales *et al.*, 2017). Some works on agave have focused on obtaining cellulose of different purities. For instance, lignocelluloses (Singha & Rana, 2010) are obtained by soaking the agave in water for 28 days, washing it with detergent and extracting lipids with acetone. Microfibrillated cellulose (Alila *et al.*, 2013) is obtained through the alkaline method which involves pressure and bleaching treatments. Nanocrystalline cellulose (Deepa *et al.*, 2015; Rosli *et al.*, 2013) is obtained with an alkaline and bleaching process that ends with acid hydrolysis. These works do not consider, nor include, the recovery of fractions or components that may be obtained during the processes of cellulose isolation.

Various forms of analysis: Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray diffraction (XRD), and thermal gravimetric analysis (TGA) in different types of biomass directly and individually have been used to characterize the properties of lignocellulosic materials. Nevertheless, the impact of each treatment in the proposed disintegration sequence remaining unknown. Therefore, the aim of this work was to study the changes in *A. salmiana* waste after a sequence of disintegration treatments through a physicochemical, spectroscopic, and thermogravimetric characterization. To do so, once the sample was pulverized (particle size <180  $\mu\text{m}$ ), a first extraction using Petroleum ether was performed, followed by extraction with water, alkaline hydrolysis, and bleaching.

## Materials and Methods

The prime material was agave leaves (*A. salmiana*) aged 10 years old. These were obtained from the pulque agroindustry and collected in Nanacamilpa, Tlaxcala

Los métodos de desintegración fisicoquímica son favorables para producir celulosa, ya que tiene la posibilidad de recuperar subproductos que pueden ser de interés para las industrias química, farmacéutica, alimentos y sectores bioenergéticos.

Las propiedades de la biomasa lignocelulósica se han estudiado en diferentes tipos de fuentes como cáscara de arroz (Johar *et al.*, 2012), residuos de la planta del plátano (Elanthikkal *et al.*, 2010), paja de trigo (Sun *et al.*, 2005), bagazo de manzana molida y algas marinas (Avendaño-Morales *et al.*, 2017). Algunos trabajos se han enfocado en obtener celulosa de diferentes purezas. Por ejemplo, lignocelulosas (Singha & Rana, 2010) son obtenidas remojando el agave en agua por 28 días, lavando con detergente y extrayendo lípidos con acetona. La celulosa microfibrilada (Alila *et al.*, 2013) se ha obtenido a través de un método alcalino que implica tratamientos con presión. La celulosa nanocrystalina (Deepa *et al.*, 2015; Rosli *et al.*, 2013) se obtiene con un proceso alcalino y blanqueamiento que termina con una hidrólisis ácida. Estos trabajos no consideran, ni incluyen, la recuperación de fracciones o componentes que se puedan obtener durante el proceso de aislamiento de celulosa.

Varias formas de análisis: espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), difracción de rayos X (XRD), y análisis termogravimétricos (TGA) se han usado en diferentes tipos de biomasa directa e individualmente para caracterizar las propiedades de materiales lignocelulósicos. Sin embargo, el impacto de cada tratamiento en la secuencia de desintegración se desconoce. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios en residuo de *A. salmiana* después de una secuencia de tratamientos de desintegración a través de una caracterización fisicoquímica, espectroscópica y termogravimétrica. Para lograrlo, una vez que la muestra se pulverizó (tamaño de partícula <180  $\mu\text{m}$ ), se realizó una primera extracción con éter de petróleo, se continuó con extracción con agua, hidrólisis alcalina, y blanqueamiento.

## Materiales y Métodos

La materia prima fueron hojas de agave (*A. salmiana*) de 10 años. Estos se obtuvieron de la agroindustria del pulque y se recolectaron en Nanacamilpa, Tlaxcala (México). Las hojas se lavaron, se secaron con aire, y se cortaron en secciones de 1  $\text{cm}^3$ . Luego se determinó el contenido de humedad. Las muestras se liofilizaron y se almacenaron en frascos herméticos a 4  $^{\circ}\text{C}$ , como esta descrito en la Figura 1. Los reactivos químicos utilizados

(Mexico). The leaves were washed, air-dried, and cut 1 cm<sup>3</sup> sections. Then the moisture content was determined. The samples were freeze-dried and stored in air-tight flasks at 4 °C, as described in Figure 1. The chemical reagents used in the physicochemical treatments were Petroleum ether (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) (PQ06323), Sodium hydroxide (NaOH) (PQ36903), obtained from Fermont; Sodium chlorite (NaClO<sub>2</sub>) (R5292), Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (R3263) purchased from Reasol; Disodium salt of ethylenediaminetetraacetate (EDTA) (E4884), Magnesium sulphate (MgSO<sub>4</sub>) (793612) were obtained from Sigma-Aldrich; and distilled water (H<sub>2</sub>O).

#### Physicochemical disintegration of *A. salmiana*

The freeze-dried matter was pulverized (particle <180 μm, 80 mesh) using a using a Knifetec™ 1.095 mill. The resulting sample was named M0 and underwent continuous disintegration through a series of treatments:

en los tratamientos fisicoquímicos fueron éter de petróleo (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) (PQ06323), hidróxido de sodio (NaOH) (PQ36903), se obtuvieron de Fermont; clorito de sodio (NaClO<sub>2</sub>) (R5292), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (R3263), se obtuvieron de Reasol; etilendiaminetetracetato disódico (EDTA) (E4884), sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) (793612) se obtuvieron de Sigma-Aldrich; y agua destilada (H<sub>2</sub>O) grado reactivo.

#### Desintegración fisicoquímica de *A. salmiana*

La muestra liofilizada se pulverizó (partícula <180 μm, malla 80) usando un molino Knifetec™ 1,095. La muestra obtenida se llamó M0 y se aplicó desintegración continua a través de una serie de tratamientos: (i) Una muestra M0 (3 g) 6-horas de extracción soxhlet de compuestos solubles en éter de petróleo (200 mL), el solvente residual de la muestra se evaporó a temperatura ambiente (24-28°C) toda la noche. Se registró el peso, y la muestra se llamó M1. (ii) Para la eliminación de la materia soluble en agua, se utilizó

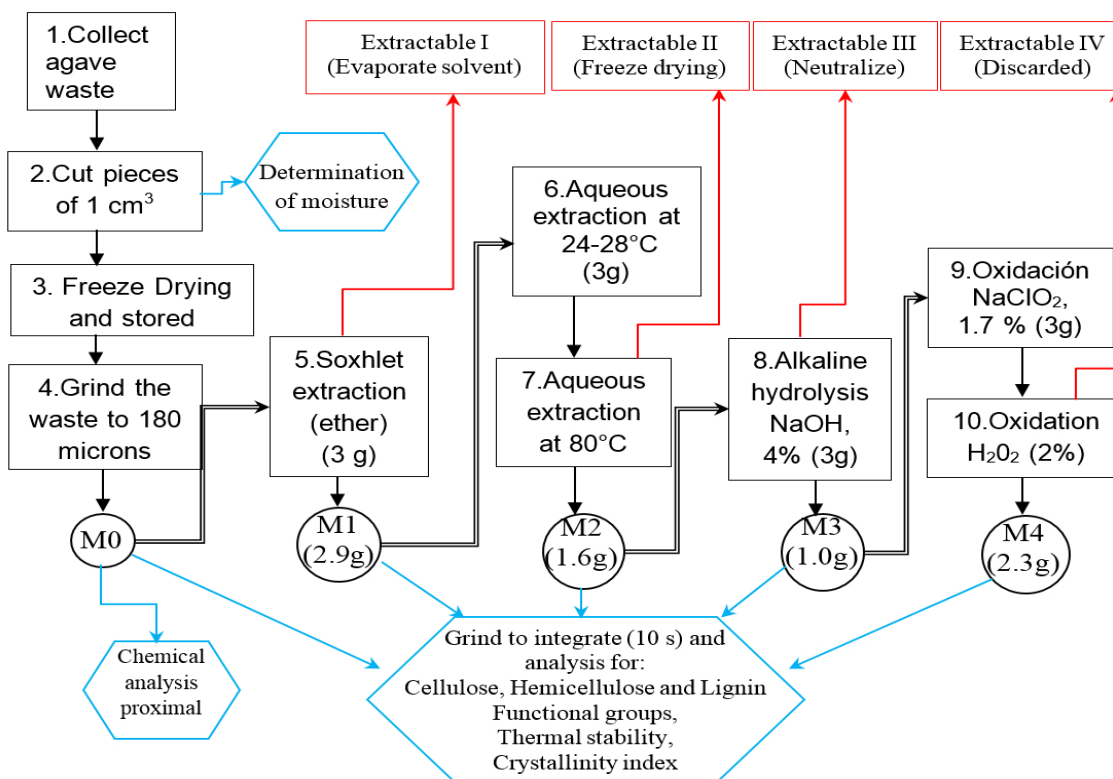


Figure 1. Flow diagram shows the process of disintegration of *A. salmiana* waste

Figura 1. Diagrama de flujo donde se presenta la descripción general de los procesos de desintegración.

(i) The extraction of Petroleum ether soluble compounds was carried out for 6 hours in Soxhlet, starting from 3 g of M0. The residual solvent of the sample was evaporated at room temperature (24–28 °C) overnight. The weight was recorded, and the sample was named M1. (ii) For the elimination of water soluble matter, the methodology reported by Santos *et al.*, (2013) was used. 3 g of M1, was suspended in distilled water (M1/Water 1:10 p/v) and kept under agitation (600 rpm) at room temperature (24–28 °C). The mixture was centrifuged (10,304 g) at 4 °C for 10 min and suspended again in distilled water (residue M1/Water 1:10) at 80 °C and kept under stirring for 30 minutes. The mixture was centrifuged (10,304 g) at 4 °C and washed twice using distilled water at room temperature. The aqueous extract was lyophilized and weighed. The precipitate was dehydrated in an oven at 100 °C for 4 h; the weight was recorded and the sample was called M2.

(iii) The disintegration by alkaline hydrolysis was done taking 3 g of M2 sample and hydrolysed twice with 4 % w/v NaOH (sample M2/NaOH 4 % 1:25 w/v) at 70–80 °C for 2 h. The mix was centrifuged at 927 g, 10 °C for 20 min. The precipitate was washed three times with distilled water and dried on an oven at 100°C for 4 h (Johar *et al.*, 2012; Rosli *et al.*, 2013). The weight of the matter was recorded, and the sample it was named M3. Finally, (iv) the disintegration by oxidation was carried out in two stages. 3 g of lyophilized (sample M3) was subjected to bleaching with 1.7 % w/v NaClO<sub>2</sub> (M3/NaClO<sub>2</sub> 1.7 % w/v 1:25) at 70–90 °C for 4 h. The precipitate was centrifuged at 10,304 g and washed three times with distilled water. Then, the pulp was deposited in a centrifuge tube and 2 % v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added. The mix was heated at 70–90 °C in a water bath for 20 min, and 1 % w/v EDTA disodium salt dehydrate, 2 % w/v MgSO<sub>4</sub>, and 0.6 % w/v NaOH were added (Loureiro *et al.*, 2011). The mix was centrifuged (10,304 g 10 min) and washed three times with distilled water and dried at 100 °C for 4 h (sample M4). All the treatments were performed in triplicate. Each sample M1, M2, M3 and M4 were desegregated using 1.095 Knifetec™ mill per 10 seconds to get a particle size <180 µm.

#### Physicochemical characterization of lignocelulose

The methods described by AOAC (1995) were used to determine moisture (934.01), ash (923.03), and ether extract (920.39). The total proteins were determined with the modified Kjeldahl-Gunning-Arnold method, using

la metodología reportada por Santos *et al.*, (2013). 3 g de M1, se suspendieron en agua destilada (M1/Agua 1:10 p/v) y se mantuvieron bajo agitación (600 rpm) a temperatura ambiente (24–28 °C). La mezcla se centrifugó (10,304 g) a 4 °C durante 10 min, y re-suspendido en agua destilada (M1/agua 1:10) a 80 °C por 30 min con agitación magnética constante (600 rpm). La mezcla se centrifugó (10,304 g) a 4 °C y se lavó dos veces usando agua destilada a temperatura ambiente. El extracto acuoso se liofilizó y pesó. El precipitado se deshidrato en una estufa a 100 °C por 4 h; se registró el peso y la muestra se llamó M2.

(iii) La desintegración por hidrólisis alcalina se realizó tomando 3 g de muestra M2 y se hidrolizó dos veces con 4% p/v NaOH (muestra M2/NaOH 4% 1:25 p/v) a 70–80 °C durante 2 h. La mezcla fue centrifugada a 927 g y 10 °C por 20 min. El precipitado se lavó tres veces con agua destilada y se secó en una estufa a 100 °C por 4 h (Johar *et al.*, 2012; Rosli *et al.*, 2013). Se registró el peso de la materia, y la muestra se llamó M3. Finalmente, (iv) la desintegración por oxidación se realizó en dos etapas. 3 g de liofilizado (muestra M3) se sometieron a blanqueo con 1.7 % p/v de NaClO<sub>2</sub> (M3/NaClO<sub>2</sub> 1.7 % p/v 1:25) a 70–90 °C durante 4 h. el precipitado se centrifugó a 10,304 g y se enjuagó tres veces con agua destilada. Luego, la pulpa se depositó en un tubo de centrifuga y se agregó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2 % v/v. La mezcla se calentó a 70–90 °C en baño maría por 20 min, y se agregaron sal disódica deshidratada EDTA al 1 % p/v, MgSO<sub>4</sub> al 2 % p/v, y NaOH al 6 % p/v (Loureiro *et al.*, 2011). La mezcla se centrifugó (10,304 g 10 min) y se enjuagó tres veces con agua destilada y se secó a 100 °C por 4 h, se pesó y etiquetó como M4. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Cada muestra M1, M2, M3 y M4 se disgregaron utilizando el molino Knifetec™ 1,095 mill por 10 segundos para obtener un tamaño de partícula <180 µm.

#### Caracterización fisicoquímica de lignocelulosa

Los métodos descritos por la AOAC (1995) se usaron para determinar la humedad (934.01), ceniza (923.03), y extracto etéreo (920.39). Las proteínas totales se determinaron por el método Kjeldahl-Gunning-Arnold modificado, usando 6.25 como factor de conversión nitrógeno-proteína. Los azúcares reductores libres del extracto acuoso, recuperado de M2 se cuantificaron por espectrofotometría (Ting, 1956). El contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina se determinaron mediante las técnicas FOSS Fibertec™ para Fibra Detergente Neutra con α-amilasa basada en materia orgánica (αNDF<sub>om</sub>) (midiendo celulosa total, hemicelulosa y lignina) (AOAC 2002:04/ISO 16472:2005),

6.25 as factor of nitrogen-protein conversion. The reducing sugars free from the aqueous extract, recovered from M2 were quantified by spectrophotometry (Ting, 1956). The cellulose, hemicellulose, and lignin contents were determined by FOSS Fibertec™ techniques for Neutral Detergent Fiber with  $\alpha$ -amylase based on organic matter ( $\alpha$ NDF<sub>om</sub>) (measuring total cellulose, hemicellulose and lignin) (AOAC 2002:04/ISO 16472:2005), acid detergent fiber, ADF (measuring total cellulose and lignin), and acid detergent lignin, ADL (measuring total lignin) (ISO 13906:2008). All the analyses were performed in triplicate. The follow equations were used:

$$\% \text{ Lignin} = \% \text{ ADL} \quad (1)$$

Where ADL = Acid Detergent Lignin

$$\% \text{ Cellulose} = \% \text{ ADF} - \% \text{ ADL} \quad (2)$$

Where ADF = Acid Detergent Fiber and  
ADL = Acid Detergent Lignin

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \% \alpha\text{NDFom} - \% \text{ ADF} \quad (3)$$

Where  $\alpha$ NDFom = Neutral Detergent Fiber and ADF = Acid Detergent Fiber .

## Instrumental analysis of lignocellulose

### Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

The samples (M0-M4) were analyzed with FT-IR. The pulverized sample (2 mg, approximately), homogenized and compressed with Potassium bromide (disk), was analyzed in a Tensor 27 infrared spectrophotometer (Bruker, Germany). The spectrum scanning was done from 400 to 4,000  $\text{cm}^{-1}$  and the maximum resolution was 1  $\text{cm}^{-1}$  (Rosli *et al.*, 2013).

### X-ray diffraction (XRD)

The diffractograms of the samples (M0-M4) were obtained with a D8 ADVANCE X-ray diffractometer (Bruker, Germany), using Cu K $\alpha$  radiation ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ , 40 kV, and 40 mA), nickel filter, and a scintillation counter as detector. Measurements were conducted with a powder technique (3 to 37° rotation, 2 $\theta$  range, and 0.05°, 15 s step) (Rosli *et al.*, 2013). The crystallinity index (CI) percent was calculated using Eq. 4:

$$CI (\%) = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100 \quad (4)$$

Fibra Detergente Ácida, ADF (midiendo celulosa total y lignina), y Lignina Detergente Ácida, ADL (midiendo la lignina total) (ISO 13906: 2008). Todos los análisis se realizaron por triplicado. Se usaron las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Lignina} = \% \text{ ADL} \quad (1)$$

Donde ADL = Lignina Detergente Ácida

$$\% \text{ Celulosa} = \% \text{ ADF} - \% \text{ ADL} \quad (2)$$

Donde ADF = Fibra Detergente Ácida y  
ADL = Lignina Detergente Ácida

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \% \alpha\text{NDFom} - \% \text{ ADF} \quad (3)$$

Donde  $\alpha$ NDFom = Fibra Detergente Neutra y ADF = Fibra Detergente Ácida.

## Análisis instrumental de lignocelulosa

### Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

Las muestras (M0-M4) fueron analizadas con FT-IR. La muestra pulverizada (2 mg, aproximadamente) homogenizada y comprimida con bromuro de potasio (disco), fue analizada con un espectrofotómetro infrarrojo Tensor 27 (Bruker, Alemania). El espectro de barrido se realizó de 400 a 4,000  $\text{cm}^{-1}$  y la resolución máxima fue de 1  $\text{cm}^{-1}$  (Rosli *et al.*, 2013).

### Difracción de rayos X(XRD)

Los difractogramas de las muestras (M0-M4) se obtuvieron con un difractómetro de rayos X D8 ADVANCE (Bruker, Alemania), usando radiación Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ , 40 kV, y 40 mA), filtro de níquel, y un contador de centelleo como detector. Se realizaron mediciones por la técnica de polvos (rotación de 3 a 37°, escala 2 $\theta$ , y etapas de 0.05° por 15 s) (Rosli *et al.*, 2013) el porcentaje de índice de cristalinidad (CI) se calculó utilizando la Ec. 4:

$$CI (\%) = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100 \quad (4)$$

Donde  $I_{002}$  es la intensidad máxima de la fracción cristalina (22-23°) y  $I_{am}$  es la intensidad mínima de la fracción amorfa (18-19°). Se realizó un análisis simple para cada muestra.

### Análisis termogravimétrico (TGA)

Se evaluó la estabilidad térmica de las muestras (M0-M4) utilizando un analizador termogravimétrico (Bruker, Alemania) acoplado a un analizador térmico STA 409 PC Luxx (Netzsh, Alemania). Se pesó la muestra (11 mg) en un crisol de

Where  $I_{002}$  is the maximum intensity of crystalline fraction (22–23°) and  $I_{am}$  is the minimum intensity of the amorphous fraction (18–19°). A simple analysis was performed for each sample.

#### Thermogravimetric analysis (TGA)

The thermal stability of the samples (M0-M4) was evaluated using an Equinox thermogravimetric analyzer (Bruker, Germany), coupled to a STA 409 PC Luxx thermal analyzer (Netzsch, Germany). The sample was weighed (11 mg) in a DTA/GTA alumina crucible. The operation conditions were: Argon flow of 20 mL min<sup>-1</sup>, heating from room temperature to 700 °C and flow velocity of 10 °C min<sup>-1</sup>. A simple analysis was performed per sample (Rosli *et al.*, 2013).

#### Statistical analysis

The data was analyzed by one-way ANOVA and post hoc Tukey's test. The OriginPro 8 software to estimate the statistical differences ( $p \leq 0.05$ ) was used.

## Results and Discussion

### Physicochemical characterization of lignocellulose

#### Chemical composition

The moisture content of the agave leaves was 86.08 %  $\pm$  0.15. This value was close to the one reported for mature agave (89.5 %) without sap extraction (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2008). The reduced loss of moisture might be explained by the inherent ability of the plant to retain water (Linton & Nobel, 2001). This is a relevant characteristic since it could allow for recovering soluble components (free sugars and others) in the aqueous medium. On the other hand, the freeze-dried bio fiber lost 4.3 %  $\pm$  0.3 of its weight after heating (100 °C, 4h). This loss represents the fraction corresponding to volatile components and/or intermolecular water as was later proven by the TGA and FTIR. This value was considered for the calculations in dry base. The chemical composition of the agave leaves is shown in Table 1.

The main components are  $\alpha$ NDF<sub>om</sub> (22.15 %, cellulose, hemicellulose, and lignin) and reducing sugars (26.47 %), with fructose being the largest fraction of the latter. Pinos-Rodríguez *et al.*, (2008) have previously reported 27.2 % of NDF and 24.7 % of free sugars in mature *A. salmiana* leaves. This difference could be related to the proportion of hydrolyzed starch due to the use of  $\alpha$ -amylase in this

alúmina DTA/GTA. Las condiciones de operación fueron: flujo de argón de 20 mL min<sup>-1</sup>, calentamiento desde temperatura ambiente hasta 700 °C y velocidad de flujo de 10 °C min<sup>-1</sup>. Se realizó un análisis sencillo por muestra (Rosli *et al.*, 2013).

#### Análisis estadístico

Los datos se analizaron por ANOVA de una vía y contraste de medias utilizando la prueba de Tukey. Para estimar las diferencias estadísticas ( $p \leq 0.05$ ) se usó el software OriginPro 8.

## Resultados y Discusión

### Caracterización fisicoquímica de lignocelulosa

#### Composición química

El contenido de humedad de hojas de agave fue de 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 poca pérdida de humedad se puede explicar por la habilidad natural de la planta para retener agua (Linton & Nobel, 2001). Esta característica es relevante ya que podría permitir la recuperación de componentes solubles (azúcares libres y otros) en el medio acuoso. Por otro lado, la biofibra liofilizada perdió 4.3 %  $\pm$  0.3 de su peso después de calentarlo (100 °C, 4h). Esta pérdida representa la fracción correspondiente a componentes volátiles y/o agua intermolecular como se probó más tarde por los análisis de infrarrojo y termogravimétricos. Estos valores se consideraron para los cálculos en base seca. La composición química de las hojas de agave se presenta en el Tabla 1.

Los principales componentes del residuo son  $\alpha$ NDF<sub>om</sub> (22.15 %, celulosa, hemicelulosa, y lignina) y azúcares reductores (26.47 %), siendo la fructosa la fracción mayoritaria de éstos. Pinos-Rodríguez *et al.*, (2008) han reportado previamente 27.2 % de NDF y 24.7 % de azúcares libres en hojas maduras de *A. salmiana*. Esta diferencia podría estar relacionada a la proporción de almidón hidrolizado debido al uso de  $\alpha$ -amilasa en este trabajo, considerando que Pinos-Rodríguez *et al.*, (2008) no usaron esta enzima.

Por lo que se puede decir que, hubo una alta concentración de azúcares, considerando que es una biomasa residual. La cantidad de azúcares reductores en bagazo de *A. tequilana* fue más bajo (12.68 %) (Arrizon *et al.*, 2010). Adicionalmente, el extracto acuoso contenía 52.45 %  $\pm$  0.91 base seca. Este valor es más alto que el reportado para aguamiel de *A. mapisaga* (11.5 % base seca) (Basurto-Ortiz *et al.*, 2008).

**Table 1.**  
**Chemical composition of *A. salmiana* leaf waste (M0).**

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

| Individual component            | % dry weight     | Fractions           | % dry weight     |
|---------------------------------|------------------|---------------------|------------------|
| <b><math>\alpha</math>NDFom</b> | 22.15 $\pm$ 0.09 | <b>Celulosa</b>     | 18.94 $\pm$ 0.07 |
|                                 |                  | <b>Hemicelulosa</b> | 0.95 $\pm$ 0.09  |
|                                 |                  | <b>Lignina</b>      | 2.26 $\pm$ 0.02  |
| <b>Free reducing sugars</b>     | 26.47 $\pm$ 0.89 | <b>Glucosa</b>      | 7.68 $\pm$ 1.35  |
|                                 |                  | <b>Fructosa</b>     | 18.78 $\pm$ 0.73 |
| <b>Protein</b>                  | 5.10 $\pm$ 0.25  |                     |                  |
| <b>Ash</b>                      | 5.12 $\pm$ 0.07  |                     |                  |
| <b>Ether extract</b>            | 0.73 $\pm$ 0.03  |                     |                  |

$\alpha$ NDF<sub>om</sub> = Neutral detergent fiber, dry organic matter basis, using  $\alpha$ -amylase; Average values  $\pm$  standard deviation; n = 3.

$\alpha$ NDF<sub>om</sub> = Fibra detergente neutra, con base a materia orgánica, usando  $\alpha$ -amilasa; Valores promedio  $\pm$  desviación estándar; n = 3.

work, considering Pinos-Rodríguez *et al.*, (2008) did not use this enzyme.

Therefore, there was a high concentration of sugars, considering it is residual biomass and that, for instance, the amount of reducing sugars in *A. tequilana* bagasse was lower (12.68 %) (Arrizon *et al.*, 2010). Additionally, the aqueous extracts contained 52.45 %  $\pm$  0.91 dry weight. This value is higher than the one reported for *A. mapisaga* syrup (11.5 % dry matter) (Basurto-Ortiz *et al.*, 2008). Furthermore, some authors indicate that the aqueous extract is composed of fructooligosaccharides (FOS) (Apolinário *et al.*, 2014), pectins (Santos *et al.*, 2013) and minerals (Basurto-Ortiz *et al.*, 2008) among others. This could be used to recover sugars with hot water as pre-treatment and convert them into bioethanol through fermentation (FitzPatrick *et al.*, 2010). Besides, the yield of bio fibers could be improved while the amount of chemicals in later treatments might be minimized. Moreover, the content of proteins and ash was low (5 % each one), given that minerals (Fe, Ca, P), proteins, and aminoacids (Santos-Zea *et al.*, 2012) are also obtained during the extraction process of agave sap.

#### Cellulose, hemicellulose and lignin content

It is important to consider that there is an increase in the proportion of cellulose from 18.67 % in M0 to 75.40 % in M3 (Table 2), this is due to the extraction of acid and fatty alcohols, free sterols and alkanes with ether as well as free sugars, FOS (Praznik *et al.*, 2013), and part of the

Además, algunos autores mencionan que el extracto acuoso está compuesto de fructooligosacáridos (FOS) (Apolinário *et al.*, 2014), pectinas (Santos *et al.*, 2013) y minerales (Basurto-Ortiz *et al.*, 2008) entre otros. Esto se podría usar para recuperar azúcares con agua caliente como pretratamiento y convertirlos en bioetanol por fermentación (FitzPatrick *et al.*, 2010). Por un lado, el rendimiento de las biofibras podría mejorarse, mientras que la cantidad de productos químicos en los tratamientos posteriores se podría minimizar. Además, el contenido de proteínas y cenizas fue bajo (5 % cada una), dado que los minerales (Fe, Ca, P), proteínas y aminoácidos (Santos-Zea *et al.*, 2012) también se obtienen durante el proceso de extracción de aguamiel.

#### Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina

Es importante considerar que hay un incremento en la producción de celulosa desde 18.67 % en M0 hasta 75.40 % en M3 (Tabla 2), esto se debe a la extracción de ácidos y alcoholes grasos, esteroides libres y alcanos con éter, así como azúcares libres, FOS (Praznik *et al.*, 2013) y parte de la hemicelulosa (Peng *et al.*, 2012) por los métodos acuosos frío y caliente. Por su parte, la hidrólisis alcalina disuelve la materia amorfa constituida de celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina (Le Troedec *et al.*, 2008). La celulosa se incrementó hasta 78.88 % (M4) por blanqueamiento. Entonces, esta secuencia de tratamiento limpia, extiende, y blanquea la superficie de la biofibra, dejando la materia lignocelulósica disponible. Rosli *et al.*, (2013) han reportado un incremento en la  $\alpha$ -celulosa de biofibras de *A.*



hemicellulose (Peng *et al.*, 2012) by hot and cold aqueous methods. For its part, alkaline hydrolysis dissolves the amorphous matter made up of cellulose, hemicellulose, lignin, and pectin (Le Troedec *et al.*, 2008). The cellulose was increasing until 78.88 % (M4) by bleaching. Then, this sequence of treatments cleaned, extended, and bleached the bio fiber surface, leaving the lignocellulosic matter available. Rosli *et al.*, (2013) have reported an increase in the  $\alpha$ -cellulose of *A. angustifolia* bio fibers from 67 to 87 % by alkaline hydrolysis and of 97 % by bleaching. Deepa *et al.*, (2015) recovered 38.8 % of nanocelluloses from *A. sisilana* bio fibers by combining the alkaline treatment, bleaching and acid hydrolysis. The high yield of cellulose (M3 and M4) is useful to recover lignocellulosic material to define the cost-benefit relationship when applying biomaterials (Singh *et al.*, 2015). In addition, recovering high levels of soluble carbohydrates (glucose, fructose, and FOS) could increase the benefits.

### Structural characterization of lignocellulose

#### Identifying chemical bonds by FT-IR

Figure 2, shows the infrared spectra of the lignocellulosic matter (M0-M4). The band at 3,280  $\text{cm}^{-1}$  corresponds to the arrangement of OH groups, assigned to free carboxyl groups associated with cellulose or lignin (Sain & Panthapulakkal, 2006). The absorption bands between 2,750 and 3,000  $\text{cm}^{-1}$  characteristic of the stretching

*angustifolia* desde 67 a 87 % por hidrólisis alcalina y de 97 % por blanqueamiento. Deepa *et al.*, (2015) recuperó 38.8 % de nanocelulosa desde biofibras de *A. sisilana* combinando el tratamiento alcalino, blanqueamiento e hidrólisis ácida. El alto rendimiento de celulosa (M3 y M4) es útil para recuperar material lignocelulósicos para definir la relación costo-beneficio cuando se aplica a biomateriales (Singh *et al.*, 2015). Además; la recuperación de altos niveles de carbohidratos (glucosa, fructosa, y FOS) podría incrementar los beneficios.

### Caracterización estructural de lignocelulosa

#### Identificación de enlaces químicos por FT-IR

La Figura 2 muestra el espectro infrarrojo de la materia lignocelulósica (M0-M4). La banda de 3.280  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la disposición de los grupos OH, asignados a grupos carboxilo libres asociados con celulosa o lignina (Sain y Panthapulakkal, 2006). Sin embargo, la intensidad de la señal (% de transmitancia) disminuye de M0 (0.17) hasta M4 (0.03) debido al pre - tratamiento por extracción acuosa (carbohidratos solubles) y extracción con éter (ácidos y alcoholes grasos) así como hidrólisis alcalina y blanqueamiento. En consecuencia, El empaquetado de la lignocelulosa se debilita y hay un incremento en la celulosa expuesta (Abraham *et al.*, 2011). Al mismo tiempo. Las bandas de absorción entre 2,750 y 3,000  $\text{cm}^{-1}$  característicos de las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-H y que corresponden a alcanos y anillos aromáticos (Khaili *et al.*,

**Table 2.**  
Changes in the content of cellulose, hemicellulose, and lignin in *A. salmiana* waste.

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

| Sample | (% dry organic matter weight) |                              |                              |
|--------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|        | Cellulose                     | Hemicellulose                | Lignin                       |
| M0     | 18.67 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup> | 1.17 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup> | 2.30 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup> |
| M1     | 18.18 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup> | 1.51 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup> | 2.28 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup> |
| M2     | 52.90 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup> | 5.75 $\pm$ 0.76 <sup>b</sup> | 7.53 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup> |
| M3     | 75.40 $\pm$ 0.85 <sup>c</sup> | 8.90 $\pm$ 1.20 <sup>c</sup> | 4.20 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup> |
| M4     | 78.88 $\pm$ 0.65 <sup>d</sup> | 6.53 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup> | 5.16 $\pm$ 1.03 <sup>b</sup> |

Average values  $\pm$  standard deviation, n = 3, different letters in the column show significant statistical difference ( $p \leq 0.05$ ), according to Tukey's test. Consecutive treatments: M0 (no treatment); M1 (extraction with Petroleum ether); M2 (aqueous extraction at 25 and 80 °C); M3 (alkaline hydrolysis with 4 % NaOH); and M4 (bleaching with 1.7 %  $\text{NaClO}_2$  and 2 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Valores promedio  $\pm$  desviación estándar, n = 3, letras diferentes en la columna muestran 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 (extracción acuosa a 25 y 80 °C); M3 (hidrólisis alcalina con NaOH al 4 %); y M4 (Blanqueamiento con  $\text{NaClO}_2$  1.7 % y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 2 %).

vibrations of the C-H bond, corresponding to the aromatic rings and alkanes (Khalil *et al.*, 2001), showed changes in intensity due to the treatments. The intensity of the signal (% transmittance) lowers from M0 (0.17) to M4 (0.03) due to the aqueous (soluble carbohydrates) and ether (acids and fatty alcohols) pre-treatment for extraction, as well as, alkaline hydrolysis and bio fiber bleaching. In consequence, the packing of the lignocellulose is weakened and there is an increase in exposed cellulose (Abraham *et al.*, 2011).

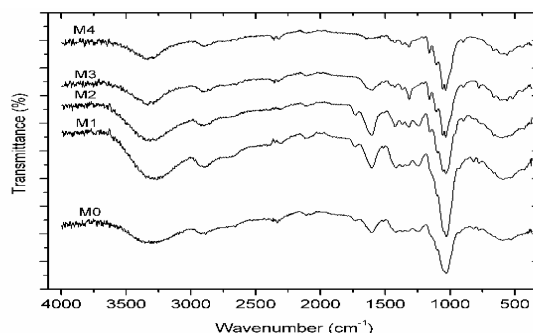
The absorption band between 1,500 and 1,750  $\text{cm}^{-1}$ , corresponding to the stretching vibration of the C=O bond, lowers its intensity (M0-M3) until it nearly disappears (M4). This behavior is a consequence of the extraction of acids and fatty alcohols using Petroleum ether and water as well as pectin, hemicellulose, and lignin hydrolysis (Alemdar & Sain, 2008; Sain & Panthapulakkal, 2006; Sun *et al.*, 2005). This signal is imperceptible after the alkaline treatment (M3) and bleaching (M4) because of the oxidation of the carbonyl bond caused by chlorite and peroxide (Elanthikkal *et al.*, 2010). The absorption band (1,516  $\text{cm}^{-1}$ ) corresponding to the vibration C=C of the lignin aromatic ring is found within the same range (Elanthikkal *et al.*, 2010). In addition, in the range 1,000–1,250  $\text{cm}^{-1}$ , there is a signal (1,242  $\text{cm}^{-1}$ ) belonging to the stretching outside the plane of the aryl C-O bond of lignin (Le Troedec *et al.*, 2008) that reduces the intensity of M0 (0.19) with pre-treatment M1 (0.16) and M2 (0.12), but mainly through alkaline hydrolysis M3 (0.09) and bleaching M4 (0.05) because of the reduction of hemicellulose and lignin. Melo *et al.*, (2017) reported that  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  recalcitrance may be tentatively confirmed by the presence of its characteristic absorption bands at ca. 1,620–1,630 and ca. 1,320  $\text{cm}^{-1}$ .

All the samples show signals that are typical of the cellulose in the fingerprint region (1,500–500  $\text{cm}^{-1}$ ). In this region, the absorption bands between 1,417 and 1,426  $\text{cm}^{-1}$  correspond to the asymmetrical deformation of the C-H bond (Elanthikkal *et al.*, 2010). This signal shifts to a greater wave number because of the alkaline (M3) and bleaching (M4) treatments. In 1,368  $\text{cm}^{-1}$  we observed the flexion of the cellulose C-H and O-H bonds (Marques *et al.*, 2010); although they have also been reported in 1,380  $\text{cm}^{-1}$  (Alemdar & Sain, 2008; Sun *et al.*, 2005). The absorption band in 1,315  $\text{cm}^{-1}$  observed in M2, M3, and M4 is a consequence of the vibrations of the C-C and C-O bonds of the cellulose ring structure. Sun *et al.*, (2005) reported this shift in 1,327  $\text{cm}^{-1}$  for lignocellulosic matter

2001) también muestran cambios en la intensidad debido a los tratamientos.

La banda de absorción entre 1,500 y 1,750  $\text{cm}^{-1}$ , corresponde a la vibración de estiramiento del enlace C=O, disminuye su intensidad (M0-M3) hasta casi desaparecer (M4). Este comportamiento es una consecuencia de la extracción de ácidos y alcoholes grasos utilizando éter de petróleo y agua así como la hidrólisis de pectina, hemicelulosa, y lignina (Alemdar & Sain, 2008; Sain & Panthapulakkal, 2006; Sun *et al.*, 2005). Esta señal es imperceptible después del tratamiento alcalino (M3) y blanqueamiento (M4) debido a la oxidación del enlace carbonilo ocasionado por el clorito y peróxido (Elanthikkal *et al.*, 2010). Además, en el intervalo de 1,000-1,250  $\text{cm}^{-1}$ , hay una señal (1,242  $\text{cm}^{-1}$ ) relacionado al estiramiento fuera del plano del enlace C-O arilo de la lignina (Le Troedec *et al.*, 2008) que reduce la intensidad de M0 (0.19) con pre-tratamiento M1 (0.16) y M2 (0.12), pero principalmente a través de la hidrólisis alcalina M3 (0.09) y blanqueamiento M4 (0.05) debido a la reducción de hemicelulosa y lignina. Recientemente, Melo *et al.*, (2017) reportaron que la recalcitrancia de  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  puede confirmarse tentativamente por la presencia de sus bandas características de absorción en aproximadamente 1,620-1,630 y 1,320  $\text{cm}^{-1}$ .

Todas las muestras presentan señales que son típicas de la celulosa en la región de huella digital (1,500-500  $\text{cm}^{-1}$ ). En esta región, las bandas de absorción entre 1,417 y 1,426  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la deformación asimétrica del enlace C-H (Elanthikkal *et al.*, 2010). Esta señal se desplaza a números de ondas más grandes de los tratamientos alcalino (M3) y blanqueamiento (M4). En 1,368  $\text{cm}^{-1}$  observamos la flexión de los enlaces C-H y OH (Marques *et al.*, 2010) aunque también se han reportado en 1,380  $\text{cm}^{-1}$  (Alemdar & Sain, 2008; Sun *et al.*, 2005). La banda de absorción 1,315  $\text{cm}^{-1}$  observada en M2, M3, y M4 es una consecuencia de las vibraciones de los enlaces C-C y C-O de la estructura cíclica de la celulosa. Sun *et al.*, (2005) reportaron este desplazamiento en 1,327  $\text{cm}^{-1}$  para materia lignocelulósica en cáscara de trigo. La señal con la transmitancia más baja se observó entre 1,021 y 1,029  $\text{cm}^{-1}$  para todas las muestras. Esta señal fue ocasionada por la vibración en los enlaces C-O-C del anillo de la piranosa (Elanthikkal *et al.*, 2010). Entre tanto, el desplazamiento en 896  $\text{cm}^{-1}$  observado en M2, M3 y M4 está relacionado al estiramiento de los enlaces C-H y C-O de la celulosa ocasionado por la deformación de los enlaces C-H  $\beta$ -glicosídico, apoyado por la vibración anular y flexión de enlace -O-H (Alemdar & Sain, 2008; Nacos *et al.*,



**Figure 2.** FT-IR spectra of *A. salmiana* lignocellulose. This figure shows consecutive treatments: M0 (no treatment); M1 (extraction with petroleum ether); M2 (aqueous extraction at 25 and 80 °C); M3 (alkaline hydrolysis with 4 % NaOH); and M4 (bleaching with 1.7 % NaClO<sub>2</sub> and 2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

**Figura 2.** Espectro FT-IR de lignocelulosa de *A. salmiana*, en pastilla de KBr. 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 NaClO<sub>2</sub> 1.7 % y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2 %).

in wheat shells. The signal with the lowest transmittance was observed between 1,021 and 1,029 cm<sup>-1</sup> for all the samples. The signal observed between 1,021 and 1,029 cm<sup>-1</sup> was caused by the vibration in the C-O-C bonds of the pyranose ring (Elanthikkal *et al.*, 2010). Meanwhile, the shift in 896 cm<sup>-1</sup> observed in M2, M3, and M4 is related to the stretching of the cellulose C-H and C-O bonds caused by the deformation of the β-glycosidic-C-H- bond, aided by ring vibration and flexion of -O-H (Alemdar & Sain, 2008; Nacos *et al.*, 2006) The absorption bands observed in 1,052; 1,104 and 1,159 cm<sup>-1</sup> are solved after the alkaline hydrolysis and the bleaching. Elanthikkal *et al.*, (2010) consider that the higher the resolution, the more the crystallinity of the cellulose.

#### Diffractograms and crystallinity index

Diffractograms M0 and M1 (Figure 3) show a central peak between 21.5° and 22.55° but no intense peaks, given that the cellulose is found at a low proportion in relation with the amorphous matter (lignin, hemicellulose, and other components). Diffractograms M3 and M4 show solved signals at 14.95, 22.55, 24.40, and 34.90°. The type I cellulose is known to show diffractions at 14, 16, 23, and 35° (Ouajai & Shanks, 2005) approximately; while type II cellulose shows signals at 11, 20, 22, and 37° in a 2θ range (Qin *et al.*, 2008). Therefore, the diffraction angles of M3 and M4 indicate that the crystalline fraction of the cellulose is type I, which is like what Oudiani *et al.*, (2011) reported for *A. americana* bio fiber. On the other hand, the narrow

2006). Las bandas de absorción observados en 1,052; 1,104 y 1,159 cm<sup>-1</sup> está mejor definido después de la hidrólisis alcalina y el blanqueamiento. Elanthikkal *et al.*, (2010) consideraron que, a mayor resolución, mayor cristalinidad de la celulosa.

#### Diffractogramas e índices de cristalinidad

Los diffractogramas M0 y M1 (Figura 3) muestran un pico central entre 21.5° y 22.55° pero no picos intensos, dado que la celulosa se encuentra en una baja proporción en relación con la materia amorfa (lignina, hemicelulosa, y otros componentes). Los diffractogramas M3 y M4 presentaron señales resueltas a 14.95, 22.55, 24.40 y 34.90°. Se sabe que la celulosa tipo I presenta difracciones aproximadamente a 14, 16, 23 y 35° (Ouajai & Shanks, 2005); mientras que la celulosa tipo II muestra señales en 11, 20, 22, y 37° en la escala 2θ (Qin *et al.*, 2008). Por lo tanto, los ángulos de difracción de M3 y M4 indican que la fracción cristalina de la celulosa es del tipo I, lo cual coincide con lo reportado por Oudiani *et al.*, (2011) para la biofibra de *A. americana*. Por otro lado, el pico agudo de 24.40° en M3 y M4 puede ser debido a impurezas, considerando que entre 14.5 y 25.5 se han reportado impurezas inorgánicas de SiO<sub>2</sub> y CaCO<sub>3</sub> en lignina residual oxidada con clorito de sodio en el plano (1 0 1) (Ben Sghaier *et al.*, 2012); aunque se ha descrito como sales de calcio, lo más probable es que sea CaC<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, del cual se sabe que las plantas sintetizan y almacenan en sus tejidos (pared celular y vacuolas) (Melo *et al.*, 2017).

El Tabla 3 muestra un incremento de 29.39-65.66 % en el porcentaje del índice de cristalinidad, el cual fue más grande para M3. Este incremento en la cristalinidad se atribuye a dos

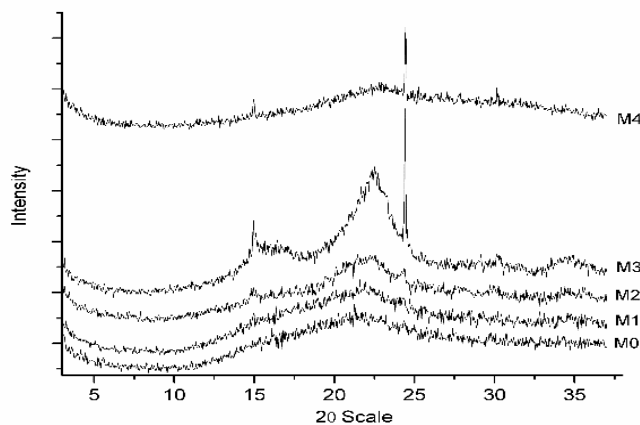


Figure 3. Diffractograms of *A. salmiana* lignocellulose, powder technique. Consecutive treatments: M0 (no treatment); M1 (extraction with Petroleum ether); M2 (aqueous extraction at 25 and 80 °C); M3 (alkaline hydrolysis with 4 % NaOH); and M4 (bleaching with 1.7 % NaClO<sub>2</sub> and 2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Figura 3. Difractogramas de lignocelulosa de *A. salmiana*, técnica de polvos. 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 NaClO<sub>2</sub> 1.7 % y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2 %).

Table 3.  
Indexes of crystallinity in *A. salmiana* lignocellulose.

Tabla 3.  
Índices de cristalinidad en lignocelulosa de *A. salmiana*.

|           | 2θ (am) (°) | I <sub>am</sub> (Counts) | 2θ (002) (°) | I <sub>002</sub> (Counts) | Crystallinity indexes, % |
|-----------|-------------|--------------------------|--------------|---------------------------|--------------------------|
| <b>M0</b> | 18.05       | 197                      | 22.30        | 279                       | 29.39                    |
| <b>M1</b> | 18.10       | 224                      | 22.25        | 326                       | 31.29                    |
| <b>M2</b> | 18.00       | 154                      | 22.55        | 321                       | 52.02                    |
| <b>M3</b> | 18.75       | 182                      | 22.50        | 565                       | 67.79                    |
| <b>M4</b> | 18.35       | 121                      | 22.80        | 236                       | 48.73                    |

I<sub>am</sub>, cellulose amorphous phase; 002, cellulose crystalline phase. Consecutive treatments: M0 (no treatment); M1 (extraction with petroleum ether); M2 (aqueous extraction at 25 and 80 °C); M3 (alkaline hydrolysis with 4 % NaOH); and M4 (bleached with 1.7 % NaClO<sub>2</sub> and 2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

I<sub>am</sub> fase amorfa de celulosa; 002 fase cristalina de la celulosa. 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 NaClO<sub>2</sub> 1.7 % y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2 %).

peak of 24.40° in M3 and M4 may be due to impurities, considering that between 14.5 and 25.5 SiO<sub>2</sub> and CaCO<sub>3</sub> inorganic impurities have been reported in residual lignin oxidized with sodium chlorite in the plane (1 0 1) (Ben Sghaier *et al.*, 2012); although has been reported as calcium salts, most likely is CaC<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, which is known to be synthesized by plants and stored in their tissues (cell wall and vacuoles) (Melo *et al.*, 2017).

Table 3 shows an increase of 29.39–65.66 % in the crystallinity index percent, which was greater for M3. This increase in crystallinity is attributed to two effects: a) the progressive removal of some amorphous constituents as free sugars, starch, hemicellulose and easily removal lignin; and b) the rearrangement of crystalline region into a more crystalline nature (Johar *et al.*, 2012; Rosli *et al.*, 2013). However, bleaching has a contrary effect, since the crystallinity index decreased from 65.6 to 48.7 % for M4.

This result is opposite to the reported by others who studied rice husk (Johar *et al.*, 2012) and agave fiber (Rosli *et al.*, 2013) using Sodium hydroxide (4 %) as first step and Sodium chlorite (1.7 %) as bleaching. Their results showed an increase (50.2–56.5 and 69-74 %) of crystallinity index percent. However, we use a combination of bleaching methods, the first one with sodium chlorite and the second with hydrogen peroxide. In the second step, a greener technology, the perhydroxyl anion (HOO<sup>-</sup>) remove conjugated carbonyl groups of lignin and the hydroxyl (HO<sup>·</sup>) and peroxy (·O<sub>2</sub>) radicals produce an oxidative decomposition of lignin aromatic rings.

The reactivity of this radical in lignin is slightly higher than in cellulose. In addition, if the hydrogen peroxide is decomposed too fast, the concentration of radicals become high and lignin and cellulose degradation is produced (Bajpai, 2012). Some transition metals catalyze these decompositions, then some authors have proposed protect the cellulose adding chelates as EDTA and magnesium salts (Loureiro *et al.*, 2011) during peroxide bleaching. Table 1 show that the cellulose was increased after bleaching. This cellulose could be amorphous, because increasing amorphous cellulose and/or avoiding its degradation will result a decreasing in the crystallinity index.

#### Thermograms and Thermal stability

The thermal stability of *A. salmiana* lignocellulose was monitored by thermogravimetric curves (Figure 4a).

efectos: a) la separación progresiva de algunos constituyentes amorfos como azúcares libres, almidón, hemicelulosa y lignina fácilmente separada; y b) el reacomodo de la región cristalina en una de naturaleza mas más cristalina (Johar *et al.*, 2012; Rosli *et al.*, 2013). Sin embargo, el blanqueamiento tiene un efecto contrario, ya que el índice de cristalinidad disminuyó de 65.6 hasta 48.7 % para M4.

Este resultado es opuesto a lo reportado por otros investigadores que estudiaron cáscara de arroz (Johar *et al.*, 2012) y fibra de agave (Rosli *et al.*, 2013) usando hidróxido de sodio (4 %) como primera etapa y clorito de sodio (1.7 %) como blanqueo. Sus resultados mostraron un incremento de cristalinidad (50.2-56.5 y 69-74 %). Sin embargo, en nuestro caso usamos una combinación de métodos de blanqueamiento, el primero con clorito de sodio y el segundo con peróxido de hidrógeno. En la segunda etapa, una tecnología verde, el anión perhidroxilo (HOO<sup>-</sup>) elimina grupos carbonilos conjugados de lignina y los radicales hidroxilo (HO<sup>·</sup>) y peróxido (·O<sub>2</sub>) producen una descomposición oxidativa de los anillos aromáticos de la lignina.

La reactividad de este radical en la lignina es ligeramente mayor que en la celulosa. Además, si el peróxido de hidrógeno se descompone demasiado rápido, la concentración de los radicales llega a ser alta, produciendo la degradación de la celulosa y la lignina (Bajpai, 2012). Algunos metales de transición catalizan estas descomposiciones, por lo tanto, algunos autores han sugerido proteger la celulosa agregando agentes quelantes como el EDTA y sales de magnesio (Loureiro *et al.*, 2011) durante el proceso de blanqueamiento. La tabla 1 muestra que la celulosa aumentó después del blanqueo. Esta celulosa podría ser amorfa, ya que al aumentar la celulosa amorfa y/o evitar su degradación, el índice de cristalinidad disminuirá.

#### Termogramas y estabilidad térmica

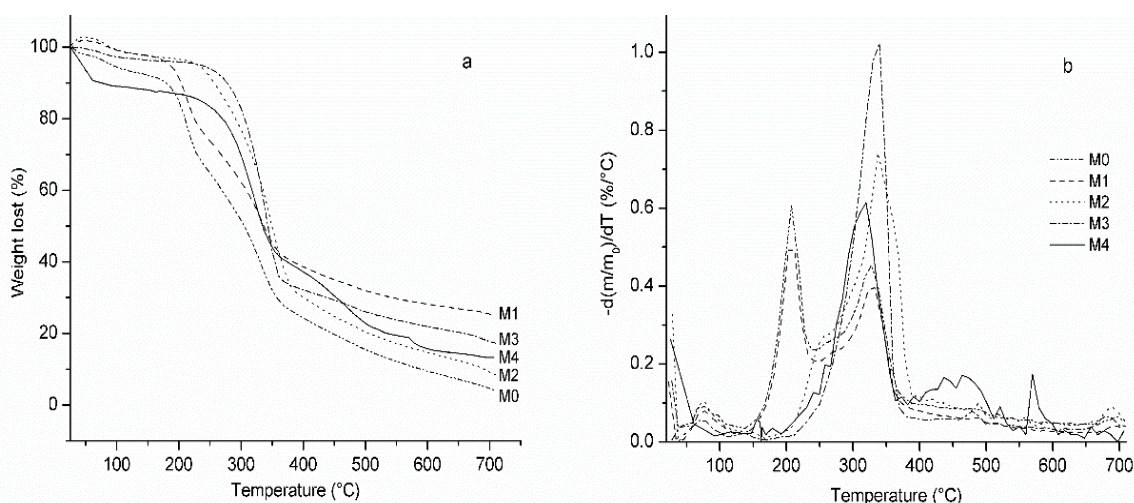
La estabilidad térmica de lignocelulosa de *A. salmiana* fue monitoreada por curvas termogravimétricas (Figura 4a). De las mediciones se crearon los espectros termogravimétricos diferenciales (Figura 4b). Los termogramas M0 y M1 son similares pero diferentes de M2-M4 (Figura 4b). A una temperatura de 208 °C, observamos un pico en M0 y M1, el cual desaparece en los espectros de M2-M4. Esto es debido a la pérdida de ácidos grasos (extracción con éter de petróleo) e hidrosolubles (extracción acuosa). Por el contrario, en M2-M4, observamos un pico amplio (210-380 °C) relacionado a la pirólisis de hemicelulosa y celulosa (Carrier *et al.*, 2011), el cual fue más intenso en M3 centrado a 340 °C lo que significa que esta muestra es la más estable térmicamente.

From the measurements, differential thermogravimetric spectra (Figure 4b) were created. M0 and M1 thermograms are like each other but different from M2-M4 (Figure 4b). At a temperature of 208 °C, we observe a peak in M0 and M1, which disappears in the spectra of M2-M4. This is due to the loss of fatty acids (Petroleum ether extraction) and hydro soluble (aqueous extraction) components. Also in M2-M4, we observe a wide peak (210–380 °C) related to the pyrolysis of hemicellulose and cellulose (Carrier *et al.*, 2011), which was more intense in M3 at 340 °C which means this sample is the most stable thermally. This behavior is mainly caused by a high content of cellulose and the highest crystallinity because of alkaline treatment. Furthermore, the highest peak for M4 was at 320 °C, 20 °C lower than M3, attributable to the fact that changes in crystalline cellulose occurred during lignin degradation by bleaching. M4 also shows peaks between 400 and 600 °C because of lignin fractions formed by its oxidation.

The thermogravimetric curves confirm the pyrolytic behavior (Figure 4a). At a temperature <100 °C, we observed a 2–10 % loss of mass (M0-M4), with the M4

Este comportamiento es causado principalmente por un alto contenido de celulosa y la mayor cristalinidad debido al tratamiento alcalino. Además, el pico más alto para M4 fue a 320 °C, 20 °C más bajo que M3, atribuible al hecho de que los cambios en la celulosa cristalina ocurrieron durante la degradación de la lignina por el blanqueo. M4 también presenta picos entre 400 y 600 °C ocasionadas por las fracciones de lignina que se formaron por su oxidación.

Las curvas termogravimétricas confirman el comportamiento pirólitico (Figura 4a). A una temperatura <100 °C, observamos una pérdida de masa de 2-10 % (M0-M4), siendo la muestra M4 la que presenta la pérdida más grande (10 %). Estas pérdidas se podrían explicar por la evaporación de agua y la presencia de sustancias volátiles. A temperaturas entre 170 y 380 °C, se dio lugar una pérdida rápida de masa (45-65 %), siendo M0 la muestra que presentó la estabilidad más baja cuando se compara a M3, la cual registro la estabilidad térmica más alta. La degradación en M0 fue causada por un mayor número de componentes termosensibles (lípidos y azúcares libres) presentes aun en la biofibra sin tratamiento. En temperaturas por debajo de 380 °C los carbonos de la lignina son oxidados (Singha & Rana, 2010; Tronc *et al.*, 2007), mostrando una decremento



**Figure 4. Thermal stability of *A. salmiana* lignocellulose. (a) Thermogravimetric curves and (b) differential thermogravimetric spectra. Consecutive treatments: M0 (no treatment); M1 (extraction with Petroleum ether); M2 (aqueous extraction at 25 and 80 °C); M3 (alkaline hydrolysis with 4 % NaOH); and M4 (bleaching with 1.7 % NaClO<sub>2</sub> and 2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).**

**Figura 4. La estabilidad térmica de lignocelulosa de *A. salmiana*. (a) curvas termogravimétricas y (b) espectro termogravimétrico diferencial. 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 NaClO<sub>2</sub> 1.7 % y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2 %).**

sample suffering the greatest loss (10 %). These losses could be explained because by water evaporation and the presence of volatile substances. At temperatures between 170 and 380 °C, a fast loss of mass (45–65 %) takes place, being M0 the sample that shows the lowest thermal stability when compared to M3, which registered the highest thermal stability. The degradation in M0 was caused by a higher number of thermosensitive components (lipids and free sugars) still present in the bio fiber. At temperatures lower than 380 °C carbons of lignin are oxidized (Singha & Rana, 2010; Tronc *et al.*, 2007), showing a gradual and slow decrease in the loss of mass. Finally, at 700 °C, between 80 and 90 % of the lignocellulose is volatilized. This pyrolytic behavior of *A. salmiana* bio fibers is like the one reported by Carrier *et al.*, (2011) who observed that the greatest loss of mass in poplar wood and fern is produced at 300–350 °C, where the hemicellulose is degraded at 200–300°C,  $\alpha$ -cellulose at 250–350 °C, and lignin at 200–500 °C. Similarly, Tronc *et al.*, (2007) state that Weber blue *Agave tequilana* bio fibers are degraded at around 350 °C while the same occurs for lignin at temperatures higher than 450 °C. After these analyses, it was determined that alkaline hydrolysis provides more thermal stability to lignocellulosic matter, that lignocellulose bleaching loses thermal resistance and reduces the crystallinity index, even though it considerably improves whiteness. The last process could be omitted if we wish a high crystallinity index to get better materials as a reinforcer. By other side, the bleached matter could be used to produce biofuel or grafted copolymers where the amorphous cellulose is preferred because the enzymatic reaction is easier, or the grafting is increased.

## Conclusions

Cellulose was enriched mainly by aqueous extraction and alkaline hydrolysis. The initial biomass contained free glucose and fructose that could be used in biotechnological processes after being extracted. The elimination of components allowed for observing a FT-IR spectrum with more defined cellulose signals and signal reduction, which mainly corresponds to chemical bonds C=O and lignin aromatics. The elimination of carbohydrates with aqueous extraction, the increase in thermal stability of lignocellulosic material after alkaline hydrolysis and the formation of some lignin fragments during bleaching were determined through thermogravimetric analyses. The material with the highest crystallinity index was obtained after alkaline hydrolysis, and could be applied as materials reinforcement. Finally, bleaching reduces crystallinity by 20 %; this lignocellulose could be used to increase cellulose hydrolysis to create biofuels or in copolymerization reactions. These

lento y gradual en la pérdida de masa. Finalmente, a 700 °C, entre 80 y 90 % de la lignocelulosa es volatilizado. Este comportamiento pirolítico de las biofibras de *A. salmiana* es como lo reportado por Carrier *et al.*, (2011) quienes observaron que la pérdida de masa más grande en maderas suaves y helechos se produce a 300-350 °C, donde las hemicelulosas son degradadas a 200-300 °C,  $\alpha$ -celulosa a 250-350 °C, y lignina a 200-500 °C. Similarmente, Tronc *et al.*, (2007) afirmaron que biofibras de *A. tequilana* Weber blue son degradadas alrededor de 350 °C mientras que lo mismo ocurre para la lignina a temperaturas superiores a 450 °C. Después de estos análisis, se determinó que la hidrólisis alcalina genera mayor estabilidad térmica del material lignocelulósico y que la lignocelulosa blanqueada pierde resistencia térmica y se reduce el índice de cristalinidad, aún cuando mejora considerablemente a la vista. El último proceso podría omitirse si lo que se desea es un índice de cristalinidad alto y usar la lignocelulosa como refuerzo para obtener mejores materiales. Por otro lado, la materia blanqueada podría ser utilizada para producir biocombustibles o copolímeros engrapados donde se prefiere celulosa amorfa porque la reacción enzimática es más fácil, o se incrementa el porcentaje de engrapado.

## Conclusiones

La celulosa se enriqueció principalmente por extracción acuosa e hidrolisis alcalina. La biomasa inicial contenía glucosa y fructosa libre que podrían ser utilizadas en procesos biotecnológicos después de ser extraídos. La eliminación de componentes permitió observar un espectro de FT-IR con señales más definidas para la celulosa y reducción de señal, que corresponden a enlaces químicos C=O y aromáticos de lignina. La eliminación de carbohidratos por extracción acuosa, el incremento en la estabilidad térmica de material lignocelulósico después de la hidrólisis alcalina, y la formación de algunos fragmentos de lignina durante el blanqueamiento se determinaron por análisis termogravimétrico. El material con el índice de cristalinidad más alto se obtuvo después de la hidrólisis alcalina, y podría ser utilizada como reforzamiento de materiales. Finalmente, el blanqueamiento reduce la cristalinidad en un 20 %; esta lignocelulosa podría utilizarse para incrementar la hidrólisis de celulosa para producir biocombustibles o en reacciones de copolimerización. Estos resultados proporcionan una

results provide an alternative and a possible innovative way to get advantage of Agave wastes in benefit of agro-industry.

alternativa y una manera innovadora de aprovechar residuos de Agave en beneficio de la agroindustria.

## References

- Avenidaño-Morales, B., Hernandez-Martínez, R., and Valdez-Vazquez, I. (2017). Producción de lípidos por *Penicillium decumbens* a partir de la conversión directa de bagazo de macroalgas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(3): 691-702. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62053304001>
- Abraham, E., Deepa, B., Pothan, L. A., Jacob, M., Thomas, S., Cvelbar, U., and Anandjiwala, R. (2011). Extraction of nanocellulose fibrils from lignocellulosic fibres: A novel approach. *Carbohydrate Polymers*, 86(4): 1468–1475. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.034>
- Alemdar, A., & Sain, M. (2008). Biocomposites from wheat straw nanofibers: Morphology, thermal and mechanical properties. *Composites Science and Technology*, 68(2): 557–565. <http://doi.org/10.1016/j.compscitech.2007.05.044>
- Alila, S., Besbes, I., Vilar, M. R., Mutjé, P., and Boufi, S. (2013). Non-woody plants as raw materials for production of microfibrillated cellulose (MFC): A comparative study. *Industrial Crops and Products*, 41(1): 250–259. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.028>
- Apolinário, A. C., De Lima Damasceno, B. P. G., De Macêdo Beltrão, N. E., Pessoa, A., Converti, A., and Da Silva, J. A. (2014). Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydrate Polymers*, 101(1): 368–378. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.081>
- Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A., and Monsan, P. (2010). Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of Agave tequilana plants of different ages. *Food Chemistry*, 122(1): 123–130. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.028>
- Bajpai, P. (2012). *5 - Hydrogen Peroxide Bleaching. Environmentally Benign Approaches for Pulp Bleaching* (2nd ed.). *Environmentally Benign Approaches for Pulp Bleaching (Second Edition)*. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-59421-1.00005-3>
- Basurto-Ortiz, R. I., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Dornier, M., and Belleville, M.-P. (2008). Analysis of the Main Components of the Aguamiel Produced by the Maguey-Pulquero (Agave mapisaga) throughout the Harvest Period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 3682–3687. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf072767h>
- Branco, A., Santos, J. D. G., Pimentel, M. M. A. M., Osuna, J. T. A., Lima, L. S., and David, J. M. (2010). D-Mannitol from Agave sisalana biomass waste. *Industrial Crops and Products*, 32(3): 507–510. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.06.025>
- Brinchi, L., Cotana, F., Fortunati, E., and Kenny, J. M. (2013). Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass : Technology and applications. *Carbohydrate Polymers*, 94(1): 154–169. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.033>
- Carrier, M., Loppinet-Serani, A., Denux, D., Lasnier, J.-M., Ham-Pichavant, F., Cansell, F., and Aymonier, C. (2011). Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. *Biomass and Bioenergy*, 35(1): 298–307. <http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.08.067>
- Cheok, C. Y., Salman, H. A. K., and Sulaiman, R. (2014). Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, 59: 16–40. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.057>
- Chi, Z. M., Zhang, T., Cao, T. S., Liu, X. Y., Cui, W., and Zhao, C. H. (2011). Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. *Bioresource Technology*, 102(6): 4295–4303. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.086>
- Deepa, B., Abraham, E., Cordeiro, N., Mozetic, M., Mathew, A. P., Oksman, K., and Pothan, L. A. (2015). Utilization of various lignocellulosic biomass for the production of nanocellulose: a comparative study. *Cellulose*, 22(2): 1075–1090. <http://doi.org/10.1007/s10570-015-0554-x>
- Elanthikkal, S., Gopalakrishnanpanicker, U., Varghese, S., and Guthrie, J. T. (2010). Cellulose microfibrils produced from banana plant wastes: Isolation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 80(3): 852–859. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.043>



- FitzPatrick, M., Champagne, P., Cunningham, M. F., and Whitney, R. A. (2010). A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource Technology*, 101(23): 8915–8922. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.125>
- Johar, N., Ahmad, I., and Dufresne, A. (2012). Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. *Industrial Crops and Products*, 37(1): 93–99. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.016>
- Khalil, H. P. S. A., Ismail, H., Rozman, H. D., and Ahmad, M. N. (2001). The effect of acetylation on interfacial shear strength between plant fibres and various matrices. *European Polymer Journal*, 37(5): 1037–1045. [http://doi.org/10.1016/S0014-3057\(00\)00199-3](http://doi.org/10.1016/S0014-3057(00)00199-3)
- Le Troedec, M., Sedan, D., Peyratout, C., Bonnet, J. P., Smith, A., Guinebretiere, R., and Krausz, P. (2008). Influence of various chemical treatments on the composition and structure of hemp fibres. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 39(3): 514–522. <http://doi.org/10.1016/j.compositesa.2007.12.001>
- Linton, M. J., & Nobel, P. S. (2001). Hydraulic conductivity, xylem cavitation, and water potential for succulent leaves of *Agave deserti* and *Agave tequilana*. *International Journal of Plant Sciences*. <http://doi.org/10.1086/320782>
- Loureiro, P. E. G., Evtuguin, D. V., and 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): 381–390. <http://doi.org/10.1002/jctb.2527>
- Marques, G., del Río, J. C., and 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): 260–267. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.036>
- Melo, E. M. De, Clark, J. H., and Matharu, A. S. (2017). The Hy-MASS concept : Hydrothermal microwave assisted selective scissoring of cellulose for : In situ production of ( meso ) porous nanocellulose The Hy-MASS concept : hydrothermal microwave assisted selective scissoring of cellulose for in situ, (March 2018). <http://doi.org/10.1039/C7GC01378G>
- Nacos, M. K., Katapodis, P., Pappas, C., Daferera, D., Tarantilis, P. A., Christakopoulos, P., and Polissiou, M. (2006). Kenaf xylan - A source of biologically active acidic oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 66(1): 126–134. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.02.032>
- Oujai, S., & Shanks, R. A. (2005). Morphology and structure of hemp fibre after bioscouring. *Macromolecular Bioscience*, 5(2): 124–134. <http://doi.org/10.1002/mabi.200400151>
- Oudiani, A. El., Chaabouni, Y., Msahli, S. and Sakli, F. (2011). Crystal transition from cellulose I to cellulose II in NaOH treated *Agave americana* L. fibre. *Carbohydrate Polymers*, 86(3):1221–9. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.037>
- Peng, F., Peng, P., Xu, F., and Sun, R. C. (2012). Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology Advances*, 30(4): 879–903. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.018>
- Pinos-Rodríguez, J., Zamudio, M., and 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): 43–50. <http://doi.org/10.4314/sajas.v38i1.4108>
- Praznik, W., Löppert, R., Rubio, J. M., Zangger, K., and Huber, A. (2013). Structure of fructo-oligosaccharides from leaves and stem of *Agave tequilana* Weber, var. azul. *Carbohydrate Research*, 381: 64–73. <http://doi.org/10.1016/j.carres.2013.08.025>
- Qin, C., Soykeabkaew, N., Xiuyuan, N., and Peijs, T. (2008). The effect of fibre volume fraction and mercerization on the properties of all-cellulose composites. *Carbohydrate Polymers*, 71(3): 458–467. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.06.019>
- Rosli, N. A., Ahmad, I., and Abdullah, I. (2013). Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from agave *angustifolia* fibre. *BioResources*, 8(2): 1893–1908. <http://doi.org/10.15376/biores.8.2.1893-1908>
- SAGARPA. (2013). Proyecto regional 2013 de tecnologías de producción, transformación, y comercialización del agave pulquero para los estados de Hidalgo, Tlaxcala y Puebla. Boletín de prensa. Hidalgo.
- Sain, M., & Panthapulakkal, S. (2006). Bioprocess preparation of wheat straw fibers and their characterization. *Industrial Crops and Products*, 23(1): 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2005.01.006>
- Santos-Zea, L., Maria Leal-Díaz, A., Cortes-Ceballos, E., and Alejandra Gutierrez- Uribe, J. (2012). Agave (*Agave* spp.) and its Traditional Products as a Source of Bioactive Compounds. *Current Bioactive Compounds*, 8(3): 218–231. <http://doi.org/10.2174/157340712802762410>

- Santos, J. D. G., Espeleta, A. F., Branco, A., and De Assis, S. A. (2013). Aqueous extraction of pectin from sisal waste. *Carbohydrate Polymers*, 92(2): 1997–2001. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.089>
- Sifontes, C. M., & Domine, M. E. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances En Ciencias e Ingeniería*, 4(4): 15–46. [http://www.exeedu.com/publishing.cl/av\\_cienc\\_ing/2013/Vol4/Nro4/3-ACI1184-13-full.pdf](http://www.exeedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/2013/Vol4/Nro4/3-ACI1184-13-full.pdf)
- Singh, J., Suhag, M., and Dhaka, A. (2015). Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. *Carbohydrate Polymers*, 117: 624–631. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.012>
- 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), 27–42 ST–Graft Copolymerization of Methyl Metha. [http://doi.org/Pii\\_918299778\\_10.1080/10236660903299283](http://doi.org/Pii_918299778_10.1080/10236660903299283)
- Sun, X. F., Xu, F., Sun, R. C., Fowler, P., and Baird, M. S. (2005). Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw. *Carbohydrate Research*, 340(1): 97–106. <http://doi.org/10.1016/j.carres.2004.10.022>
- 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): 263–266.
- Tronc, E., Hernández-Escobar, C. A., Ibarra-Gómez, R., Estrada-Monje, A., Navarrete-Bolaños, J., and Zaragoza-Contreras, E. A. (2007). Blue agave fiber esterification for the reinforcement of thermoplastic composites. *Carbohydrate Polymers*, 67(2): 245–255. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.05.027>