

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VILLAHERMOSA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**“EVALUACIÓN DE LIRIO ACUÁTICO (*Eichhornia crassipes*) COMO
SUSTRATO POTENCIAL EN LA ELABORACIÓN DE BIOETANOL”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN INGENIERÍA

PRESENTA:

AZUCENA DEL ROSARIO FRAIRE VÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS

M.C. NORA ALICIA PURATA PÉREZ

VILLAHERMOSA, TAB.

NOVIEMBRE 2018



Carretera Villahermosa-Frontera Km. 3.5 Cd. Industrial C.P. 86010
Tel. 01 (993) 353-02-59. Villahermosa, Tabasco, México
www.itvillahermosa.edu.mx



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VILLAHERMOSA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**EVALUACIÓN DE LIRIO ACUÁTICO (*Eichhornia crassipes L.*) COMO
SUSTRATO POTENCIAL EN LA ELABORACIÓN DE BIOETANOL**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN INGENIERIA.**

**PRESENTA:
AZUCENA DEL ROSARIO FRAIRE VÁZQUEZ**

**MATRÍCULA:
M04300322**

**DIRECTOR DE TESIS:
M.C NORA ALICIA PURATA PÉREZ**

**CO- ASESOR:
M.C. ROBERTO MORALES CRUZ**

VILLAHERMOSA, TABASCO NOVIEMBRE 2018

Soy de las personas que piensan que la ciencia tiene una gran belleza.

Un científico en su laboratorio no es solo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas

-Marie Curie-

La actividad experimental de este trabajo se realizó en las instalaciones del Instituto Tecnológico Superior de Comalcalco, por lo cual deseo expresar mi más profundo agradecimiento para esta noble institución ya que sin el apoyo que tuvo a bien brindarme, no habría logrado concluir en tiempo y forma este proyecto de tesis.

Agradecimientos

A Dios: Por todo lo que me ha dado, porque me ha permitido valorar a quienes tengo a mi lado, porque a través de cada experiencia buena o mala, me permite aprender un poco más, pero sobre todo por darme la paciencia, fortaleza y sabiduría para culminar cada meta que me he planteado a lo largo de mi vida.

A mi esposo: Manuel sin tu apoyo no lo habría logrado, nunca me dejaste sola en esto. Sabes que eres mis pies y mi cabeza, gracias a ti no permanezco estática, gracias a tus consejos he aprendido a tomar mejores decisiones, pero sobre todo gracias a tu infinita paciencia soy mejor persona cada día. Así que este logro también es tuyo. Y aunque la vida nos golpee fuerte, tendrás mi amor infinito por siempre.

A mis padres: Les agradezco cada palabra de aliento, llamada de atención y sobre todo cada consejo, ahora con el paso de los años que veo en lo que me he convertido, es inevitable pensar en lo afortunada que soy por tener todo su amor y sobre todo porque me enseñaron que el trabajo duro al final tiene una dulce y valiosa recompensa.

A mi hermana: Caro tú siempre has sido “mi persona”, si pienso en alguien incondicional tu nombre es el primero que salta. Valoro tanto cada ocasión en que puedo verte, cada vez hablamos y reímos sin parar como locas. Gracias por ser mi mejor amiga, mi otra mitad, mi hermana, mi espíritu guía, te agradezco tanto cada lección de vida y fortaleza que me das en esos pequeños espacios que tu saturado ritmo te permite.

A mi amiga: Amalia gracias por estar a mi lado a través de cualquier situación, no importa si ha sido buena o mala, has estado allí. Sabes que hubieron momentos

en los que perdí el rumbo y nunca me dejaste. Gracias por seguir siendo mi amiga, incluso después de conocer mi personalidad extraña. Gracias por no juzgarme y decirme lo que necesito escuchar, aún cuando no quiera escucharlo.

A mis amigos: Alfredo, Javier, Raúl, Alejandro y Darwin que siempre me han dado ánimos para seguir en el camino de la investigación y a la par han hecho divertido el proceso, los quiero mucho.

A mi asesora: M.C. Nora Alicia Purata Pérez quien aportó todos sus conocimientos para que este proyecto funcionara, agradezco las palabras de aliento que me dio durante todo este proceso, pero, sobre todo su valiosa guía siempre sólida para enfrentar las dificultades.

A mi Co-director de tesis: M.C Roberto Morales Cruz por el apoyo y la orientación brindada, sobre todo por la paciencia y el buen ánimo al momento de realizar las correcciones. Maestro es usted un ser humano ejemplar y un docente muy valioso.

A mis sinodales: Dra. Rosa Margarita Hernández Vélez y Dra. Rocío del Carmen Antonio Cruz, porque sus puntuales guías y observaciones permitieron el enriquecimiento de este trabajo.

Índice

Índice de tablas	XI
Índice de ecuaciones	XII
Resumen	XIII
Abstract.....	XIV
Introducción.....	1
Objetivos.....	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos	4
Hipótesis	5
Hipótesis general.....	5
Capítulo I. Marco teórico.....	6
1. Biomasa.....	6
1.1 Biomasa lignocelulósica	8
1.1.1. Estructura de la biomasa lignocelulósica.....	9
1.2 Celulosa	10
1.3 Hemicelulosa.....	12
1.4 Lignina	14
1.5 Pretratamientos empleados en procesos donde se utiliza material lignocelulósico.....	15
1.6 Usos de la biomasa.....	16
1.7 Energías Renovables.....	17
1.8 Bioenergía	17
1.9 Biocombustibles	18
1.9.1 Clasificación de los biocombustibles	18

1.9.2	Biocombustibles de Primera Generación	20
1.9.3	Biocombustibles de Segunda Generación.....	20
1.9.4	Biocombustibles de Tercera Generación.....	20
1.10	Panorama internacional de los biocombustibles	21
1.11	Situación de los Biocombustibles en el México.....	23
1.12	Lirio Acuático	25
1.12.1	Clasificación taxonómica y morfología de la especie.....	26
Capítulo II. Metodología.....		28
2.1	Determinación de los puntos de muestreo	28
2.1.1	Muestreo	28
2.2	Pretratamiento de la materia prima.....	29
2.2.1	Determinación de pH en fresco.....	29
2.2.2	Determinación de humedad	30
2.2.3	Determinación de nitrógeno total.....	30
2.2.3.1	Preparación de indicador universal Shiro Tashiro	31
2.3	Hidrólisis ácida	31
2.3.1	Determinación de azúcares reductores.....	32
2.3.1.1	Preparación del reactivo DNS	33
2.3.1.2	Preparación de curva patrón	33
2.4	Fermentación	34
2.4.1	Activación de levaduras	34
2.4.2	Aislamiento de levaduras	34
2.4.2.1	Resiembra y conservación de levaduras en tubo.....	35
2.4.2.2	Morfología microscópica de las levaduras	35
2.4.2.3	Cuantificación celular	35
2.4.2.4	Preparación de curva patrón	36
2.4.3	Preparación del inóculo	36
2.4.3.1	Inoculación de jarabes glucosados	36

2.5 Cinética de reacción	37
2.5.1 Determinación cuantitativa de alcoholes	37
2.6 Cálculo de rendimiento de sustrato y productos	38
<i>CAPITULO III. Resultados y Discusión.....</i>	39
3.1 Pretratamiento de la materia prima	39
3.1.1 Determinación de pH.....	39
3.1.2 Determinación de humedad	40
3.1.4 Determinación de Nitrógeno.....	42
3.2 Hidrólisis ácida.....	42
3.2.1 Curva de calibración de DNS	42
3.2.2 Caracterización de los jarabes glucosados	43
3.2.3 Análisis de varianza	44
3.2.4 Prueba de Tukey	45
3.2.5 Verificación de los supuestos del modelo.	46
3.3 Fermentación	48
3.3.1 Aislamiento de levaduras	48
3.3.2 Resiembra y conservación de levaduras en tubos	48
3.4 Determinación cuantitativa de alcoholes	54
3.5 Rendimiento Teórico	56
<i>Conclusiones.....</i>	58
<i>Bibliografía.....</i>	59
<i>ANEXO I. Diagramas de proceso</i>	72
Pre- Tratamiento de material lignocelulósico	72
Fermentación	73
<i>Anexo II. Datos experimentales para análisis estadístico</i>	74
<i>ANEXO III. Experimentos preliminares.....</i>	76

Índice de figuras

Figura 1. Clasificación de la biomasa.	6
Figura 2. Composición de la materia lignocelulosica.....	10
Figura 3. Composición estructural de la pared celular de las plantas.....	11
Figura 4. Estructura química de la hemicelulosa	13
Figura 5. Estructura y composición química de la lignina.....	14
Figura 6. Clasificación de biocombustibles criterio SAGARPA.....	19
Figura 7. Clasificación de las fuentes para obtención de biocombustibles.	19
Figura 8. Producción de bioetanol en el mundo.	22
Figura 9. Energéticos en México.	24
Figura 10. Distribución de las plantas acuáticas invasoras en México.	26
Figura 11. Morfología de <i>E.crassipes</i>	27
Figura 12. Macrolocalización del sitio de muestreo.	29
Figura 13. Equipo de hidrólisis.	32
Figura 14. Espectrofotómetro UV-VIS Marca Hach.	33
Figura 15. Valores de pH de lirio fresco	39
Figura 16. Secado de lirio acuático.	40
Figura 17. Curva de calibración.....	43
Figura 18. Dispersión de medias.	44
Figura 19. Prueba rangos múltiples de Tukey.	46
Figura 20. Asimetría y Curtosis.	47
Figura 21. Aislamiento por estría cruzada de levadura Tradi-Pan.....	48
Figura 22. Crecimiento en tubo inclinado	49
Figura 23. Morfología microscópica de levaduras.	49
Figura 24. Curva de calibración para cuantificación de levaduras.....	50
Figura 25. Cinética de consumo de azúcares en la fermentación de jarabe 1.	52
Figura 26. Cinética de consumo de azúcares en la fermentación del jarabe 2. ...	53
Figura 27. Curva de calibración para determinación de Etanol.	55

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de la biomasa.....	7
Tabla 2. Principales fuentes biomásicas en México.....	8
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>E.crassipes</i>	27
Tabla 4. Características de los tamices.	30
Tabla 5. Diseño experimental.	31
Tabla 6. Soluciones patrón para determinación azúcares reductores.	34
Tabla 7. Componentes del medio de cultivo PDA.....	35
Tabla 8. Soluciones patrón para cuantificación de levaduras.	36
Tabla 9. Soluciones patrón para determinación de etanol	37
Tabla 10. Valores de pH en fresco.....	39
Tabla 11. Contenido de humedad.....	41
Tabla 12. Retención de partículas.	42
Tabla 14. Concentración de azúcares reductores por tratamiento y sus medias...	44
Tabla 15. ANOVA de una vía (Azúcares reductores & Ácido Sulfúrico)	45
Tabla 16. Comparación de medias (método Tukey).	45
Tabla 17. Curtosis y simetría	47
Tabla 18. Descripción de cultivos.	51
Tabla 19. Concentración de azúcares reductores en Jarabe Glucosado 1.....	51
Tabla 20. Concentración de azúcares reductores en Jarabe Glucosado 2.....	53
Tabla 21. Concentración de alcohol.....	56

Índice de ecuaciones

Ecuación 1	31
Ecuación 2	38
Ecuación 3	38
Ecuación 4	43
Ecuación 5].....	50
Ecuación 6	54
Ecuación 7	56

Resumen

En esta investigación se evaluó la factibilidad que presenta el lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) para su uso como sustrato en producción de bioetanol. Se realizó la caracterización física del sustrato y mediante la aplicación de un diseño experimental en el cual se variaron las concentraciones de ácido en relaciones volumétricas, se determinaron las condiciones hidrolíticas adecuadas para la obtención de azúcares reductores (fermentables), una vez encontrada la mejor concentración, se elaboraron los jarabes glucosados a mayor proporción, mismos que se sometieron a un proceso de fermentación. El aislamiento de la cepa, se realizó del producto comercial Tradi-Pan ya que contiene levaduras utilizadas en el proceso de panificación.

Mediante el análisis estadístico ANOVA simple y la prueba de rangos múltiples de TUKEY se establecieron las mejores condiciones del proceso de hidrólisis que fueron: concentraciones de ácido sulfúrico al 20%. Por medio de la evaluación microbiológica se determinó la concentración de microorganismos en solución favorables para la fermentación. Las cinéticas de reacción demostraron que es posible obtener etanol a partir del lirio acuático a partir de 48 h de reacción.

Se concluye que el acondicionamiento del sustrato permite su mejor manipulación y que el tratamiento químico empleado (hidrólisis ácida) permite la producción de etanol, aunque los rendimientos son bajos debido a que por cada gramo del sustrato se producen 27.009 mg/g de azúcares reductores, generando un máximo de etanol de 1.12% por lo que se recomienda continuar investigando para probar otros métodos de hidrólisis y emplear cepas genéticamente modificadas para la producción específica de alcoholes.

Abstract

In this research, the feasibility of the water lily (*Eichhornia crassipes*) for its use as a substrate in bioethanol production was evaluated. The physical characterization of the substrate was carried out and by applying an experimental design in which acid concentrations were varied in volumetric ratios, the appropriate hydrolytic conditions for obtaining reducing sugars were determined, once the best concentration was found, the glucosaded syrups were elaborated to a greater proportion, same that they underwent a process of fermentation. The strain was isolated from the commercial product Tradi-Pan since it contains yeasts used in the baking process.

By means of the simple ANOVA statistical analysis and the TUKEY multiple rangs test, the best conditions of the hydrolysis process were established: concentrations of sulfuric acid at 20%. By means of the microbiological evaluation the concentration of microorganisms in solution favorable for fermentation was determined. The reaction kinetics showed that it is possible to obtain ethanol from the water lily after 48 h of reaction.

It is concluded that the conditioning of the substrate allows its better handling and that the chemical treatment employed (acid hydrolysis) allows the production of ethanol, although the yields are low because for each gram of the substrate 27,009 mg / g of reducing sugars per 1g are produced, generating a maximum of 1.12% ethanol, so it is recommended to continue researching to test other hydrolysis methods and to use genetically modified strains for the specific production of alcohols.

Introducción

La producción de biocombustibles hoy en día, se ha considerado una opción sustentable que permite disminuir la dependencia del petróleo. A nivel mundial, aproximadamente el 90% de la energía consumida proviene de fuentes no renovables, provocando que los recursos fósiles se estén agotando aceleradamente (Becerra, 2010). Es por ello que las investigaciones en materia energética, se están dirigiendo hacia la búsqueda de nuevas fuentes de energías limpias y renovables (Muto-Lubota, 2016). Actualmente existen diferentes maneras de producir combustibles, una de ellas es utilizando materias biomásicas, estas técnicas son amigables con el medio ambiente, permiten proteger los recursos naturales tanto renovables como no renovables y sobre todo maximizar el uso de productos y sub-productos agrícolas, cuya disposición final por lo general no está controlada (Sánchez et al., 2010).

El uso de combustibles renovables se tiene registrado desde 1931, cuando en Brasil comenzó a utilizarse gasolina mezclada con bioetanol en proporciones volumétricas de 20 a 25 % (Galgano et al., 2012). El Centro de gestión de estudios estratégicos reporta que en el período de 1975 a 2005, se produjeron 275 millones de m³ de bioetanol, equivalentes a 1.510 millones de barriles de petróleo, lo que equivale a más del 11% de las reservas probadas de hidrocarburos en el subsuelo brasileño (CGEE, 2006). En la búsqueda de incorporar nuevas fuentes de energía en la matriz energética de América Latina, en Argentina se tuvo un primer impulso de desarrollo de los biocombustibles, específicamente el bioetanol (etanol anhidro), durante parte de las décadas de 1970 y 1980, poniendo en función el Programa Alconafta, promoviendo la utilización de alcohol etílico anhidro como combustible (FAO, 2013).

En México en el año 2006, el Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA) elaboró un estudio sobre la situación de los biocombustibles en el país, donde se reveló que el 8% de la

energía utilizada corresponde a energía renovables, así mismo se consideró que se cuenta con el potencial para incrementar la producción de biocombustibles (CEDRSSA, 2010). En América Latina el mayor interés en los biocombustibles se tiene en la fabricación de bioetanol, con una producción cercana a los 26,3 billones de litros, con una participación de Brasil (34,2%), seguido de Colombia (0,4%) (Morelos, 2016). De esa producción de biocombustibles, la mayor parte se centra en el uso de caña de azúcar, seguido por maíz. Dado que los biocombustibles se producen a base de alimentos, se genera una competición por la tierra utilizada así como por la disponibilidad de agua, lo que impacta el precio de los alimentos generando alza de manera directa al restringir la oferta de cereales para la alimentación, o de manera indirecta si los alimentos son insumos de ganado; donde lo que se impacta es el precio de la carne y de los lácteos (Salinas & Gasca, 2009).

Las tendencias biotecnológicas actuales apuntan hacia la producción de bioetanol de segunda generación, ya que se considera una alternativa que no atenta contra la seguridad alimentaria; debido a que la materia prima utilizada, proviene de residuos biomásicos generados en las actividades agrícolas, forestales o en su defecto proceden de especies vegetales de bajo valor comercial de las cuales se extraen azúcares fermentables (Ramos, 2009). Esta situación ha hecho despertar interés en los combustibles de segunda generación que son aquellos derivados de plantas o residuos vegetales, que no compiten directamente con los mercados alimenticios, destacando especies vegetales dedicadas a la producción de biomasa con fines energéticos (Ballesteros, 2015).

La investigación en materia combustibles renovables en México se ha realizado de manera poco significativa, por lo que es necesario obtener información acerca del uso de materias primas que no pongan en riesgo el abastecimiento de alimentos y que permitan producir los combustibles a partir de biomasa lignocelulósica. Desafortunadamente en México no existe una fuente directa de azúcares para obtener biocombustibles de segunda generación (Martínez, 2002). En este

contexto, el lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) surge como una alternativa ya que cuenta con las características apropiadas para ser estudiado como un sustrato que permita, a partir de su hidrólisis, generar azúcares fermentables útiles en la producción de bioetanol ya que actualmente se considera una planta nociva debido a su rápida propagación y crecimiento (Malik, 2007), incluso se considera que este representa un problema ambiental ya que, debido a su excesivo crecimiento, tiene la capacidad de modificar algunas propiedades físicas y químicas de los sitios donde crece provocando la contaminación en ríos, lagos, lagunas y afectando el equilibrio de ecosistema acuático (Vélez, 2014).

En el municipio de Comalcalco, Tabasco, el lirio acuático es considerado una planta invasora, debido a que no representa aportes alimenticios, económicos e incluso su crecimiento abundante en los ríos, causa problemas de oxigenación en el ecosistema afectando a la flora y fauna presente en los cuerpos de agua, ya que inhibe el crecimiento de otras especies vegetales acuáticas endémicas de la zona y debido a la eutrofización que genera provoca la migración de especies animales hacia otros sitios donde la oxigenación es mayor. Es por ello que el presente trabajo se centra en conocer el potencial del lirio acuático (*Eicchornia crassipes*) como sustrato que permita producir energía carburante a partir de su biomasa rica en unidades de celulosa y lignina, mediante la técnica de hidrólisis ácida; cabe resaltar que en el municipio de Comalcalco, Tabasco, la biomasa extraída de los cuerpos de agua proviene de diferentes especies de plantas hidrófitas, la más abundante de ellas es el lirio acuático, misma que no es aprovechada.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la viabilidad del lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) como sustrato que permita la producción de bioetanol.

Objetivos específicos

- Determinar las condiciones hidrolíticas óptimas para el procesamiento del lirio acuático en su etapa de pre-tratamiento.
- Cuantificar los azúcares reductores presentes en los jarabes glucosados.
- Evaluar el proceso de fermentación de los jarabes producidos mediante el uso de una levadura comercial.
- Establecer la tasa de rendimiento del combustible obtenido.

Hipótesis

Hipótesis general

El lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) es un sustrato potencial para la producción de bioetanol combustible.

Capítulo I. Marco teórico

1. Biomasa

De acuerdo a la Unión Europea “la biomasa es la fracción biodegradable de productos, desechos y residuos de la agricultura (incluyendo sustancias vegetales y animales), silvicultura e industrias relacionadas, así como la fracción biodegradable de los residuos municipales e industriales” (Cerdá, 2012). Esta se forma a partir de la materia orgánica formada en el proceso de desarrollo de plantas, animales y microorganismos (Alessandrini et al., 2017) en un sentido amplio, incluye diversos materiales orgánicos como madera, residuos de cosechas y desechos animales (ver figura 1). La mayoría de esta es producida por las plantas, quienes convierten la energía solar en material vegetal a través de la fotosíntesis que es un proceso donde intervienen CO₂, agua y la luz solar. Este proceso fotosintético normalmente convierte menos del 1 % de la luz solar disponible, en energía química almacenada (McKendry, 2002).



Figura 1. Clasificación de la biomasa.

La biomasa puede presentar alto potencial para la obtención de combustibles, servicios y compuestos químicos de alto valor añadido. En condiciones sustentables, la producción de energía y compuestos químicos está obligatoriamente ligada a la biomasa, particularmente a la fracción lignocelulósica de la misma (Arteaga et al., 2015). La biomasa puede clasificarse de acuerdo a sus características como se ilustra en la tabla 1 (Salinas & Gasca, 2009).

Tabla 1. Clasificación de la biomasa.

Tipo de biomasa	Características
Primaria	Es la materia orgánica formada directamente de los seres fotosintéticos. Este grupo comprende la biomasa vegetal, incluidos los residuos agrícolas y forestales.
Secundaria	Es la producida por los seres heterótrofos que utilizan en su nutrición la biomasa primaria. La constituyen la materia fecal o la carne de los animales.
Terciaria	Es la producida por los seres que se alimentan de biomasa secundaria, por ejemplo, los restos y deyecciones de los animales carnívoros que se alimentan de herbívoros.
Natural	Es la que producen los ecosistemas silvestres; 40% de la biomasa que se produce en la tierra proviene de los océanos.
Residual	La que se puede extraer de los residuos agrícolas y forestales, y de las actividades humanas.
Cultivos Energéticos	Recibe esta denominación cualquier cultivo agrícola cuya finalidad sea suministrar la biomasa para producir biocombustibles.

Fuente: Salinas & Gasca, 2009.

La Secretaría de Gobernación (SEGOB, 2013) refiere que en México existen diversas fuentes que pueden ser utilizables como sustrato con la finalidad de generar distintas formas de energía, y cada tipo presenta un potencial energético que puede variar dependiendo de la fuente de donde proviene como se muestra en la tabla 2, así mismo los cambios en el almacenamiento y distribución de la biomasa pueden también estar fuertemente influenciados por factores relacionados con el desarrollo del rodal, calidad del sitio, composición de especies, variables ambientales, densidad y prácticas agrícolas aplicadas (Chávez et al., 2016). Las plantas cultivadas son la mejor fuente de energía renovable que pueden ser utilizadas para la producción de biocombustibles (Díaz & Espinoza, 2016). Aunque hay gran disponibilidad de biomasa, la necesaria gestión para su adquisición y transporte para que pueda explotarse, hace que hayan pocas empresas interesadas en aprovecharlas.

Tabla 2. Principales fuentes biomásicas en México.

Biomasa	Fuente de proveniencia	Contenido energético (TJ)
Agrícola	Granos y oleaginosas	71,811
	Hortalizas	24,249
	Frutales	13,980
	Otros	1.878
Pecuaria	Rastros	1,353
	Granjas Porcícolas	12,806
Urbana	Plantas de tratamiento de aguas residuales	22,708
Industrial	Bagazo de caña	2,127
	Bagazo de agave	5,354
	Bagazo de Malta	153
Forestal	Biomasa de bosque de encino	202,792
	Biomasa de bosque mixto	19,568
	Biomasa de selva	1,256,239
	Biomasa de bosque de pino	82,362

Fuente: SENER, 2013.

1.1 Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es una matriz compuesta principalmente por esterres extraíbles, proteínas, carbohidratos, celulosa, hemicelulosa, lignina y material mineral. Es un heteropolímero complejo y el componente estructural de las plantas (Arellano, 2015). Se excluyen en este caso la biomasa constituida principalmente por almidón, proteínas y azúcares, como son los casos de los granos, cereales, mieles y otros; es considerada el material orgánico más abundante en la tierra (Alejandro & Navarro, 2012).

Los materiales lignocelulósicos pueden ser clasificados en tres categorías: en primer lugar la biomasa natural producida espontáneamente en las zonas no cultivadas, tanto en tierra firme como en zonas marítimas; el segundo grupo lo constituye la biomasa residual procedente de las explotaciones agrícolas y forestales, así como la generada en las industrias y en los núcleos urbanos; por

último la biomasa producida específicamente para fines energéticos (Narvaes & Martín, 2006)

El uso de este tipo de biomasa en la producción de etanol ha sido beneficioso ambientalmente ya que su aplicación a gran escala en los sistemas de transportación contribuye de forma sustancial a la reducción emisiones de CO₂, SO₂ y NO₂ (Viñals et al., 2012). Los materiales lignocelulósicos, tienen la ventaja de ser biodegradables, y renovables, siendo el resultado del proceso de fotosíntesis de los vegetales mediante la energía solar. Bajo este enfoque, su empleo como combustibles representa una forma sostenible y amigable con el medio ambiente de aprovechamiento de la energía solar (Alejandro & Navarro, 2012).

1.1.1. Estructura de la biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica presenta una estructura compleja, por lo que su conversión a etanol comprende dos etapas generales: la primera de pretratamiento e hidrólisis; donde se obtienen los azúcares simples fermentables (glucosa y xilosa), y la de fermentación en la cual estos azúcares son convertidos en etanol, por la acción de los microorganismos (Almenares et al., 2008). La biomasa lignocelulósica de origen vegetal, está conformada por tejidos de los vegetales cuyas células presentan una pared celular constituida a su vez por un entramado de micro-fibrillas de celulosa formando capas recubiertas de hemicelulosa y sobre las que se deposita la lignina (Lestari et al., 2009). Los componentes principales de las paredes celulares se pueden dividir en tres fracciones orgánicas (ver figura 2) con las siguientes composiciones representativas en peso seco: 20% -50% de celulosa, 15% -35% de hemicelulosa y 10% -30% de lignina (Rinaldi & Schuth, 2009). Además, también contiene cantidades más pequeñas de otros componentes minoritarios proteínas (3-10%), lípidos (1.5%), azúcares solubles, denominados extractivos y minerales (10.5%), que en los análisis químicos se estiman como cenizas (Morales de la Rosa, 2015).

La biomasa lignocelulósica es muy abundante y presenta un gran potencial para producir una nueva generación de combustibles líquidos utilizando los azúcares que se obtienen de la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa. Actualmente, la tecnología para la producción de biocarburantes a partir de azúcares se basa en procesos de fermentación para la producción de bioetanol (Dofur, 2012).

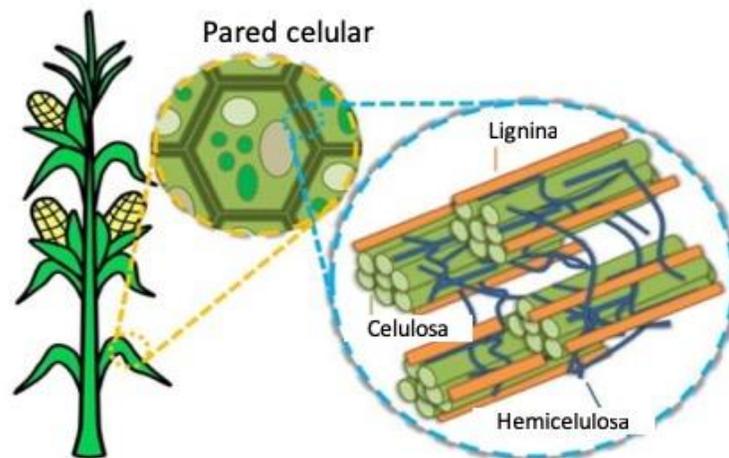


Figura 2. Composición de la materia lignocelulósica.

Fuente: Rinaldi & Schuth, 2009.

1.2 Celulosa

La celulosa es el compuesto orgánico de mayor abundancia en la naturaleza (Imai, 2003), se considera de gran importancia a nivel biológico y un polímero de interés industrial. Consiste en un polímero altamente ordenado con dominios cristalinos separados por regiones amorfas que constituyen potenciales puntos para ataques químicos y bioquímicos. Los dominios amorfo y cristalino se encuentran en las fibras de celulosa nativas en proporciones variables en función de la especie vegetal, de las condiciones de crecimiento de la misma e incluso de la parte de la planta de la que provenga (Serrano & García, 2017). Se disponen ordenadamente formando estructuras cristalinas unidas por puentes de hidrógeno inter e intramoleculares. Una fibrilla elemental contiene en torno a 36 cadenas de celulosa; 20 fibrillas elementales forman una microfibrilla (como las que se encuentran en la pared primaria de la célula); 250 microfibrillas forman una fibrilla

y, por último, unas 1.500 fibrillas forman una fibra de celulosa (Rivas, 2014). Químicamente pueden definirse como polímeros de la D-glucosa que se unen entre sí por enlaces β -1,4; esta disposición la hace muy estable, además de poseer enlaces de hidrógeno que unen sus moléculas entre sí (ver figura 3), confiriéndole sus conocidas propiedades como material estructural de la pared celular (Butt, 2006).

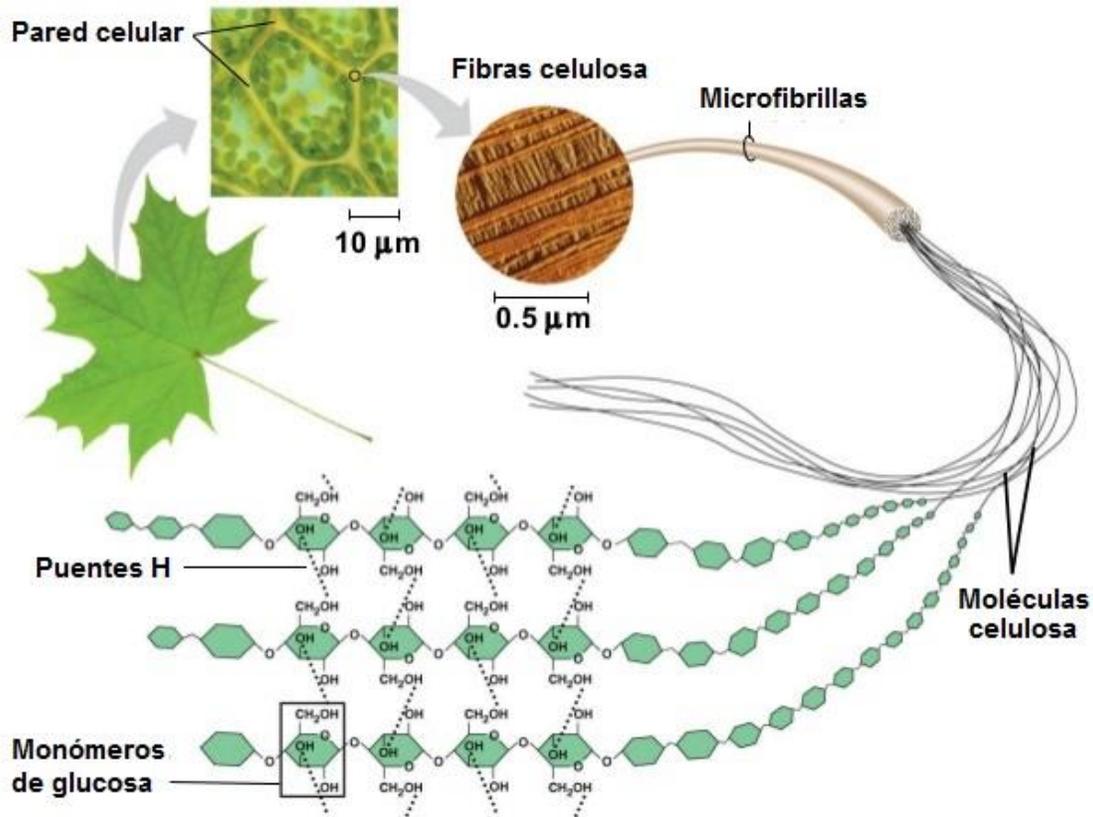


Figura 3. Composición estructural de la pared celular de las plantas.

Fuente: Butt, 2006.

El enlace glicosídico se forma por la reacción del grupo ($-\text{OH}$) hemiacetálico del carbono anomérico de la β -D-glucopiranososa con el grupo ($-\text{OH}$) del carbono 4 de otra β -D-glucopiranososa. Por esta razón, las unidades de glucosa en los extremos de la cadena celulósica no son químicamente iguales.

Uno de los extremos de la cadena de celulosa presenta un carbono anomérico que no está implicado en el enlace glicosídico, en este carbono 1 un grupo aldehído de carácter reductor y en el otro lado al final de la cadena el carbono

anomérico está protegido por el enlace glicosídico, no mostrando propiedades reductoras (Casillas, 2010).

1.3 Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante de la biomasa terrestre, después de la celulosa, la composición de la misma depende del origen o fuente del vegetal que provenga (Gibbons, 2002). Las hemicelulosas forman aproximadamente una tercera parte de los carbohidratos en las partes maderosas de las plantas. La estructura química de las hemicelulosas consiste de cadenas largas con una gran variedad de pentosas, hexosas, y sus correspondientes ácidos úronicos. Generalmente la hemicelulosa puede contener de dos a cuatro residuos de azúcares, pudiendo estas ser hexosa (D-manosa, D-glucosa y D-galactosa), pentosas (D-xilosa y D-arabinosa) o sus ácidos urónicos (ver figura 4). El nombre dependerá de la composición en azúcares (Cooper, 2013).

Las hemicelulasas también son llamadas xilanasas, que en acción con otras enzimas de manera sinérgica biodegradan a la hemicelulosa, dando como resultado xilosa y arabinosa. Esta enzima descompone los enlaces beta 1-4 xilano de la hemicelulosa en uno de sus azúcares simples, que es la xilosa (Oyola, 2017). Las hemicelulosas son polisacáridos que, excluyendo la celulosa, constituyen las paredes celulares de las plantas y se pueden extraer con soluciones alcalinas diluidas.

Los xilanos son las hemicelulosas más comunes y los polisacáridos no celulósicos más importantes de las angiospermas (por ejemplo, *monocotiledóneas* y maderas duras). Los xilanos están constituidas por un esqueleto de unidades anhidro xilopiranosil unidas por enlaces β -1-4 glicosídicos, en el cual se pueden sustituir varios residuos (Abril & Navarro, 2012). Las hemicelulosas poseen grandes aplicaciones en la industria alimentaria. Algunas veces están presentes como auxiliares tecnológicos dentro del proceso de elaboración de los alimentos, ya que son utilizados como estabilizadores de emulsiones o suspensiones; así como para dar resistencia a los materiales (Sousa et al., 2010). Las cadenas de hemicelulosa

no son lineales, tienen ramificaciones laterales y no tienen una estructura regular, este polímero no es cristalino, por lo tanto es fácilmente hidrolizado. Mientras que la celulosa siempre mantiene la misma estructura y composición, la de la hemicelulosa puede variar ampliamente entre las especies de plantas (Cunningham & López, 1994).

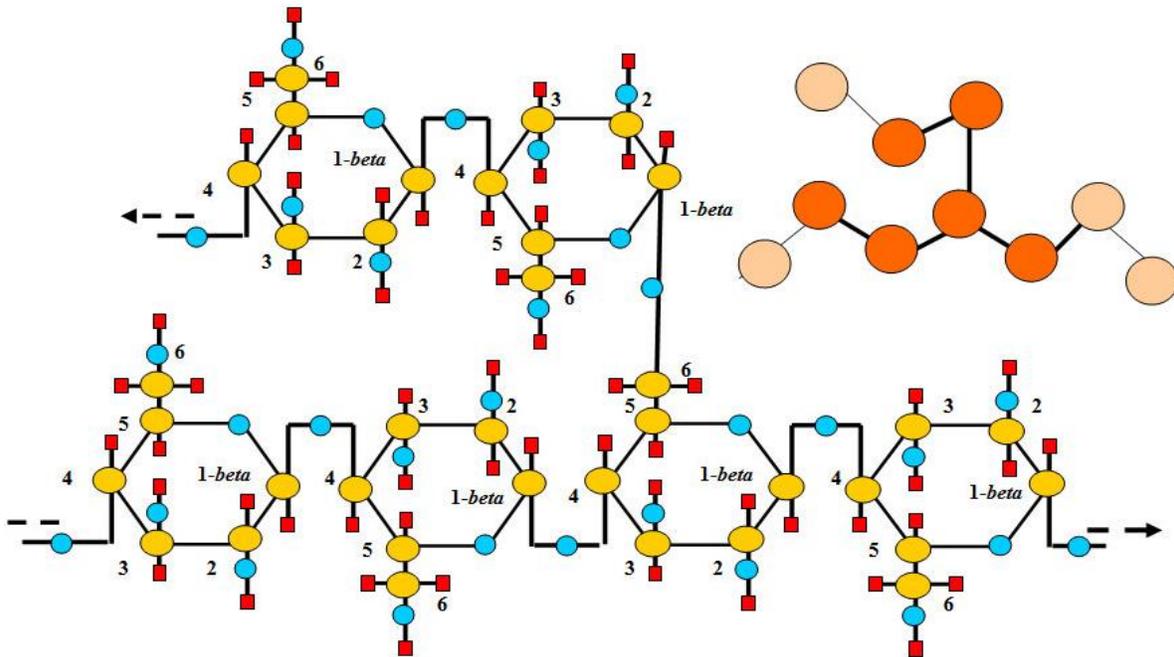


Figura 4. Estructura química de la hemicelulosa

Fuente: Cooper, 2013.

En las maderas duras predominan los xilanos, polímeros de unidades β -xilopiranosas unidas por enlaces β -1,4 que presentan ramificaciones. En los xilanos los grupos hidroxilo pueden estar sustituidos con grupos 4-O-metilglucurónico unidos por enlaces α -1,2 y por grupos acetilo unidos a través de enlaces éster en las posiciones 2 y 3 del anillo de pentosa (Rivas, 2014). En las maderas blandas el esqueleto de los xilanos es idéntico al de las maderas duras, presentando sustitución por grupos 4-O-metilglucurónico unidos por enlaces α -1,3. Los glucomananos de las maderas blandas, que poseen mayor proporción de manosa que los de las maderas duras, tienen dos tipos de sustituyentes: los grupos acetilo

unidos por enlaces éster a las posiciones 2 y 3 del esqueleto del azúcar, y la galactosa unida mediante enlaces α -1,6 (Ebringerová et al., 2015).

1.4 Lignina

La lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado formado por alcoholes aromáticos (ver figura 5) que da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y es altamente resistente a la degradación química y biológica. Puede constituir del 15 al 25% de la biomasa lignocelulósica, esta composición varía en cada especie (Cuervo et al., 2009). La lignina representa el 30% de los componentes del vegetal, es el constituyente intercelular incrustante o cementante de las células fibrosas de los vegetales. Se concentra en la lámina media y funciona prácticamente como relleno para impartir rigidez al tallo de la planta (Terán & Solorzano, 2013).

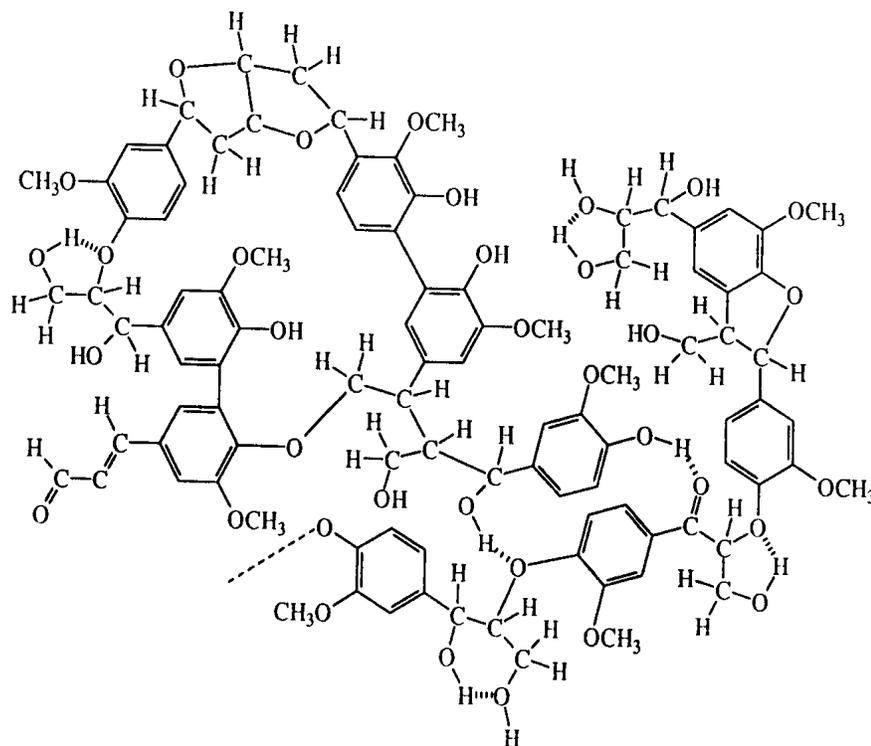


Figura 5. Estructura y composición química de la lignina.

Fuente: Bonilla, 2016.

1.5 Pretratamientos empleados en procesos donde se utiliza material lignocelulósico.

En la actualidad se han desarrollado diversos tratamientos que permiten a los materiales lignocelulósicos volverse susceptibles a la sacarificación, entre estos se incluyen los tratamientos físicos, químicos y enzimáticos (Ferrer et al., 2002).

Mecánico: Consiste particularmente en el corte de la biomasa lignocelulósica en pedazos más pequeños. El objetivo de un pretratamiento mecánico es la reducción en el tamaño de partículas, así como de la cristalinidad. La reducción de tamaño de las partículas conduce a un aumento de la superficie disponible y una reducción del grado de polimerización (Cortéz, 2014).

Térmico: Durante estos pretratamientos la biomasa lignocelulósica se calienta. Si la temperatura se incrementa por encima de los 150-200° C, parte de la biomasa lignocelulósica, primero la hemicelulosa y en poco tiempo después la lignina, comienza a ser soluble. Los compuestos producidos principalmente son compuestos fenólicos y tienen en algunos casos efectos inhibitorios o tóxicos sobre las bacterias, hongos y levaduras (Rojas, 2011).

Agua caliente: El objetivo de este pre-tratamiento es solubilizar la fracción de la hemicelulosa como oligosacáridos líquidos solubles (Sheng, 2011). para hacer a la celulosa más asequible y evitar la formación de inhibidores. Entre las ventajas que presenta este pre-tratamiento se encuentra que no emplea ningún catalizador, pero es necesario utilizar presión para mantener el agua en estado líquido a temperaturas elevadas (Rojas, 2011).

Hidrolisis ácida: El pretratamiento químico con ácido sulfúrico diluido ha sido reportado por sus altas tasas de reacción y por su efectiva hidrólisis de la celulosa (Sun & Cheng, 2002). A una temperatura moderada la sacarificación tiene bajos rendimientos. A altas temperaturas el tratamiento con ácido diluido favorece la

hidrólisis de la celulosa y se hidroliza cerca del 80% de la hemicelulosa (Cortínez, 2010).

Hidrólisis alcalina: El mecanismo de hidrólisis alcalina se basa en la saponificación de los enlaces de éster que atraviesan los xilanos en la hemicelulosa y otras

componentes como la lignina. Así, el tratamiento con NaOH diluido aumenta el área superficial y disminuye el grado de polimerización y cristalinidad por la remoción de los enlaces entre la lignina y los carbohidratos (Sun & Cheng, 2002).

Hidrólisis enzimática: Este pretratamiento utiliza la combinación de enzimas degradadoras de polisacáridos mismas que actúan sinérgicamente en la degradación de la matriz de la pared celular. La hidrólisis enzimática puede ser una mejor alternativa que la hidrólisis ácida y tiene un potencial para el desarrollo y mejoras de tecnologías para la producción etanol a partir de biomasa que puede ser competitivo con respecto otros combustibles (Martin & Thomsen, 2007).

1.6 Usos de la biomasa

Los usos de la energía producida con biomasa, son diversos y van desde calefacción, refrigeración y producción de agua caliente en el sector doméstico hasta la generación de calor para procesos industriales y generación de electricidad (Cerdá, 2012). Para el aprovechamiento de la energía de la biomasa lignocelulósica contenida en los enlaces químicos del carbono, es necesario realizar siempre una combustión. La combustión de la biomasa sólida puede realizarse directamente en un horno; sin embargo, cuando mediante tratamientos físicos, químicos y biológicos intermedios se obtienen combustibles líquidos o gaseosos, éstos se pueden quemar tanto en las calderas como en motores de combustión interna, de donde se puede extraer calor y trabajo mecánico (Abril & Navarro, 2012).

1.7 Energías Renovables

De acuerdo a la SENER, se puede definir a las energías renovables como aquellas cuya fuente reside en fenómenos de la naturaleza, procesos o materiales susceptibles de ser transformados en energía aprovechable por el ser humano, que se regeneran naturalmente, por lo que se encuentran disponibles de forma continua o periódica, y que al ser generadas no liberan emisiones contaminantes (DOF, 2015). Dentro de las energías renovables, las mas conocidas son aquellas que representan usos más fáciles, menor bagaje tecnológico y costos de inversión menores al momento de su implementación como el caso de la energía solar, biomasa, energía eólica e hidráulica, pero también existen otras menos conocidas y aplicadas debido a su costo como la mareomotriz, geotérmica, entre otras (De Juana Sardón, 2003). Las energías renovables presentan un potencial importante para mitigar los efectos negativos del consumo energético en continuo incremento, inducido tanto por el crecimiento económico, como por la transformación de las sociedades hacia modelos más energointensivos (Altomonte, Coviello, & Lutz, 2003).

1.8 Bioenergía

La Real Academia Española (RAE) define el término energía como la capacidad para realizar un trabajo. La energía puede presentarse de maneras diversas, un caso particular es la bioenergía, que se puede definir como cualquier forma de energía derivada de los biocombustibles, es decir energía química acumulada mediante procesos fotosintéticos recientes (Banco Nacional De Desarrollo, 2008).

Los vínculos entre bioenergía y seguridad alimentaria son complejos. Hacer sostenible el desarrollo de la bioenergía se convierte aún más en un reto cuando se trata de aprovechar sus beneficios potenciales en el desarrollo rural, el clima y la seguridad energética (FAO, 2018).

Es necesario un enfoque integrado para abordar estos vínculos y favorecer tanto la alimentación como los combustibles, de modo que se garantice que la bioenergía contribuye al desarrollo sostenible.

1.9 Biocombustibles

Biocombustible es el término con el cual se denomina a cualquier tipo de combustible que derive de la biomasa, nombre dado a cualquier materia orgánica de origen reciente que haya derivado de animales y vegetales como resultado de un proceso de conversión fotosintético; la energía de la biomasa deriva del material vegetal y animal, como la madera de los bosques, los residuos de procesos agrícolas y forestales, de la basura industrial, humana o animal.

1.9.1 Clasificación de los biocombustibles

De acuerdo con SAGARPA (2009), los biocombustibles se pueden ser de tres tipos grupos: bioetanol, biodiesel y biogás (ver figura 6). Los biocombustibles han sido una estrategia que ha permitido disminuir el impacto ambiental causado por el uso de combustibles fósiles. Estos ofrecen mayor seguridad energética, desarrollo rural, mejor desempeño de vehículos y reducción en la demanda de petróleo (Martínez et al., 2015).

Los dos biocombustibles más usados en el mundo son el etanol y el biodiesel. Se utilizan principalmente en los motores de vehículos como automóviles y camiones. El etanol generalmente se produce utilizando como materia prima la caña de azúcar, los cereales y el betabel. El biodiesel, que puede usarse en lugar del diesel convencional, se produce a partir de aceites vegetales o animales. Las especies más usadas para obtener biodiesel son la palma aceitera y la soya. El etanol representa cerca del 90% de la producción total de biocombustibles y el biodiesel el resto (Espinoza et al., 2018).



Bioetanol: Se produce a partir de cultivos y residuos forestales.



Biogas: Se produce con materiales biodegradables como el estiércol.



Biodiesel: Se obtiene de grasas animales y aceites vegetales.

Figura 6. Clasificación de biocombustibles criterio SAGARPA

De acuerdo con la Secretaría de Energía, los biocombustibles se clasifican en generaciones (Ver figura 7) dependiendo de la materia prima empleada en su elaboración. (Álvarez Maciel, 2009).



Primera generación:
Cultivos alimenticios



Segunda Generación:
Residuos lignocelulósicos



Tercera Generación:
Algas y bacterias

Figura 7. Clasificación de las fuentes para obtención de biocombustibles.

1.9.2 Biocombustibles de Primera Generación

Son producidos a partir de azúcares, amidas y aceites extraídos de una parte específica de plantas como caña de azúcar, trigo, maíz, palma aceitera y soya. Esos biocombustibles ya son producidos y comercializados en cantidades significativas por diversos países, respondiendo actualmente por 1,5% del total de combustibles de transporte en el mundo (Machado, 2010).

Los biocombustibles de 1ra generación utilizan cultivos específicos como materias primas; los más ampliamente difundidos son el biodiesel y el bioetanol. Este último representa más del 90% del total de biocombustibles que se utilizan actualmente en el mundo. En Brasil, Suecia y Estados Unidos existen 6 millones de vehículos circulando que pueden aceptar mezclas etanol/gasolina de hasta 85% (Serna et al., 2011).

1.9.3 Biocombustibles de Segunda Generación

Son producidos de materias-primas no alimentares como residuos agroindustriales y gramíneas forrajeras de alta producción de biomasa. Su producción es significativamente más compleja, si comparados a los De 1ra generación y todavía no son comercializados. Son clasificados según el proceso utilizado en la conversión de la biomasa: bioquímicos producidos por Hidrólisis enzimática, fermentación y termoquímicos . Las tecnologías para una conversión de Biomasa en Biocombustibles de 2da y 3ra Generación son existentes, pero todavía no aplicadas en producción de gran escala.

1.9.4 Biocombustibles de Tercera Generación

Los combustibles de tercera generación se producen con biomasa diferente a la utilizada para los biocombustibles de primera y segunda generación, su obtención está basada en tecnologías emergentes que prometen una gran cantidad de combustible por unidad de área y menores costos de producción (González &

Kafarov, 2009). Estos biocombustibles son producidos a partir de la materia prima modificada genéticamente de modo que facilita los procesos subsecuentes. Los agentes de conversión (microorganismos, algas) también son modificados genéticamente para que el proceso sea más eficiente.

1.10 Panorama internacional de los biocombustibles

En el contexto global, la bioenergía se está convirtiendo en una industria altamente dinámica. El acelerado crecimiento en la producción y uso de los biocombustibles, a nivel global (SAGARPA, S/A). Países como Brasil, Estados Unidos, Alemania, Austria, Canadá, Francia, Italia, Malasia y Suecia son pioneros en la producción, ensayo y uso de biodiesel en automóviles. Algunos de estos países iniciaron sus investigaciones desde hace 10 o 15 años y, actualmente, rigen el mercado de los biocombustibles. Además, en 2007, Brasil, India, Sudáfrica, China, Estados Unidos y la Unión Europea crearon el Foro Internacional de Biocombustibles, con el fin de que sea un mecanismo de diálogo entre los grandes productores y consumidores de biocombustibles. Mientras tanto, países como Australia, Canadá, China, Colombia, Ecuador, India, Indonesia, Malawi, México, Mozambique, Filipinas, Senegal, Sudáfrica, Tailandia y Zambia, ya han promulgado políticas para producir bioenergía (González, 2009).

Se estima que la contribución de la bioenergía al abastecimiento de la energía primaria mundial podría alcanzar el 50% hacia el año 2050, en la última década, se sumó un inesperado componente a la matriz energética mundial: los combustibles líquidos obtenidos a partir de la industrialización de granos y oleaginosas (Montico, Di Leo, Bonel, Denoia, & Costanzo, 2012). Es por esta razón que recientemente y debido a la producción de biocombustibles, especialmente el etanol de maíz, y a la escasez de otros alimentos, sus precios se incrementaron entre el 20% y el 50% FAO (2007). También los precios de los alimentos están aumentando a un ritmo acelerado en Europa, China, India y los Estados Unidos.

En 2006, los biocombustibles líquidos fueron responsables por poco más de 1% de la energía mundial renovable y poco menos de 1% de la oferta anual de petróleo bruto, evaluada en 4.800 billones de litros (Kojima & Johnson, 2005). Actualmente el biocombustible más utilizado es el etanol, cuya fermentación es una tecnología bastante antigua. En este campo, los esfuerzos en investigación han sido logros incrementales en el rendimiento de los procesos convencionales y el desarrollo de proceso para producción de etanol utilizando la biomasa lignocelulósica como materia prima (Machado, 2010).

Las propiedades del etanol como combustible llevaron al desarrollo y aplicación de motores a alcohol y motores para la mezcla alcohol-gasolina en Brasil. En 2007, la producción total mundial de ese biocombustible fue de 49,6 billones de litros y en el año siguiente alcanzó 65,3 billones de litros (EIA, 2012). Diversos países se han centrado en la producción de bioetanol, siendo Estados Unidos y Brasil quienes han destacado, para el año 2008 fue posible identificar la producción porcentual de bioetanol producido en el mundo, las proyecciones mostraron que Estados Unidos era el mayor productor generando 50%, seguido de Brasil con un 38% (ver figura 8).

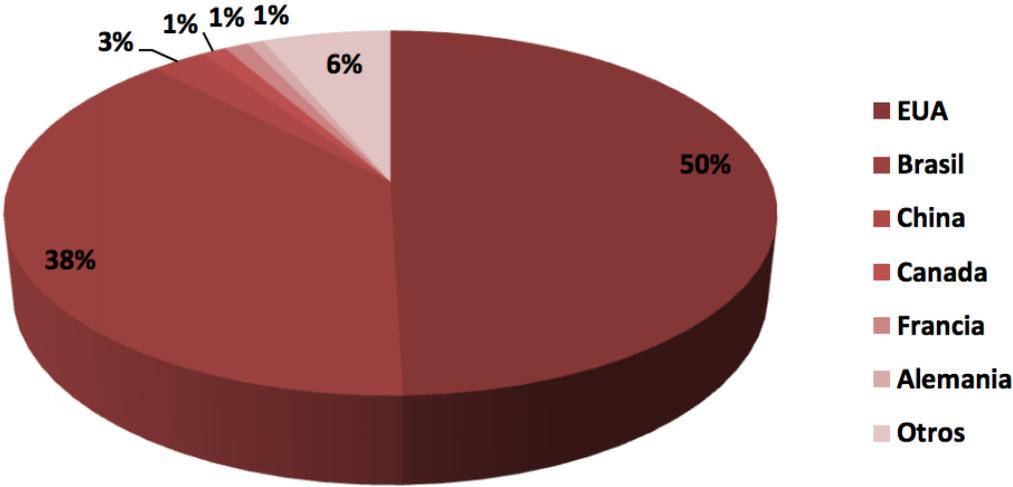


Figura 8. Producción de bioetanol en el mundo.

Fuente: EIA, 2012.

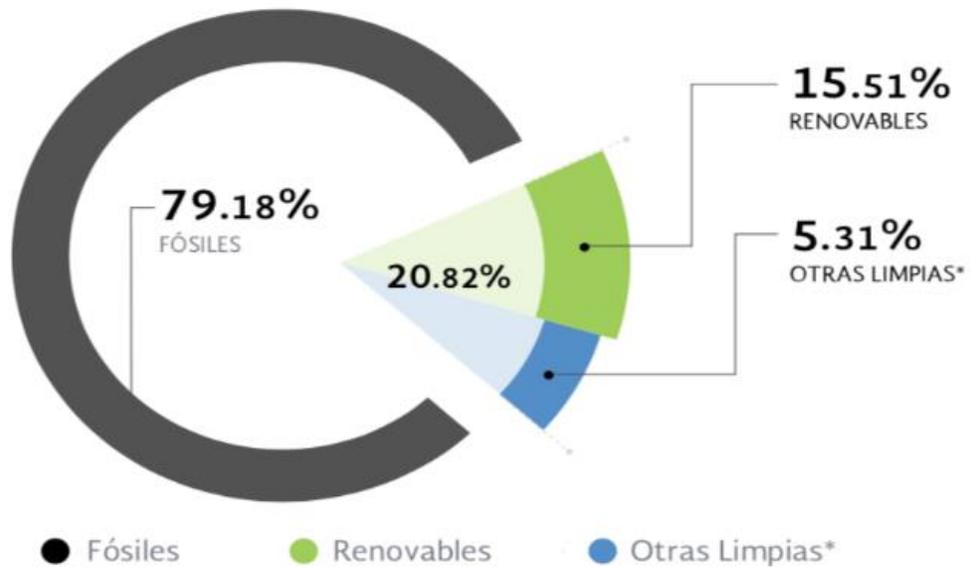
Recientemente, con la valoración de las cuestiones ambientales, el interés en el bioetanol fue nuevamente aumentado, ya que puede ser considerado como un aditivo antidetonante de la gasolina para reemplazar el producto tetraetilo de plomo que está directamente asociado a las emisiones altamente contaminantes (FAO, 2013).

1.11 Situación de los Biocombustibles en el México

México ha desarrollado políticas para el fomento de los diferentes componentes de la cadena de valor y el impulso del mercado de biocombustibles, sin desarrollar mandatos para los mercados de combustibles para el transporte, aunque el gobierno federal en el plan nacional de desarrollo 2013-2018 ha enfocado su atención en la investigación referente a elaboración de etanol anhidro, biodiesel y bioturbosina (SEGOB, 2013).

Desde el 2004 la tasa media anual de crecimiento de la generación energética con fuentes renovables ha sido del 3.2%. Al cierre del primer semestre de 2017, México generó el 20.82 % de su energía con fuentes limpias (SENER, 2017). Al 30 de junio de 2017, la generación con energías limpias alcanzó 33,274.31 GWh, que refleja un crecimiento del 8.79% con respecto al primer semestre del 2016 (ver figura 10).

Generación Total: 159,819 GWh



Incremento anual inter-semestral

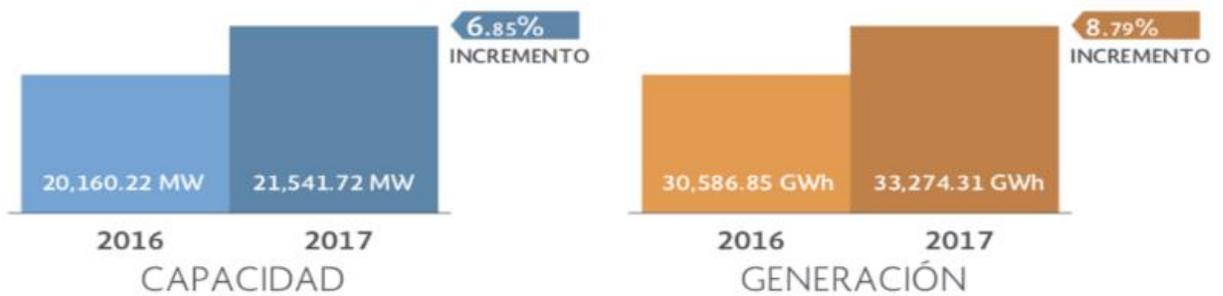


Figura 9. Energéticos en México.

Fuente: SENER,2017.

Del porcentaje de energías renovables, se estima que durante el primer semestre de 2017 se generaron 33,274.31 GWh con fuentes limpias, que representa el 20.82% de la generación nacional.

1.12 Lirio Acuático

Esta planta es originaria del Amazonas en Sudamérica, en donde se mantiene bajo control por la acción de depredadores naturales y por las inundaciones anuales que arrastran las plantas de lirio hacia el mar en donde no es capaz de sobrevivir, sin embargo, debido a la mano del hombre, el lirio acuático se ha dispersado por todas las zonas tropicales del mundo. Muy poco se conoce acerca de la introducción de esta planta en México. Se cita su presencia desde 1897 como una especie naturalizada y bastante común en las chinampas de Xochimilco (Gutiérrez, 1997).

Es considerada una de las plantas con mejor reproducción y tasa de crecimiento, por lo cual se extiende rápidamente y forma tapetes o esteras que constriñen a las plantas nativas sumergidas y flotantes en los cuerpos de agua (Harun et al., 2008), disminuye la entrada de luz y merma el oxígeno disuelto en el agua. Es también considerado una de las principales malezas de agua dulce a nivel mundial debido a su rápido crecimiento y reproducción, alta competitividad, movimiento por el viento y corrientes de agua y propagación por el hombre con fines ornamentales (González et al., 2010). Además, está considerada entre las 100 especies más invasoras del mundo por la Unión Mundial para la Naturaleza (UICN). Su capacidad reproductiva es alta, la biomasa de *E. crassipes* es capaz de duplicarse en un mes a través de reproducción vegetativa, lo que provoca la formación de densas colonias flotadoras, con el consecuente descenso del flujo de agua en los embalses, y reducción en la cantidad de luz. Existe una relación negativa entre la abundancia de *E. crassipes* y las concentraciones de oxígeno disuelto (Guevara & Ramírez, 2015)

En 2000 se calculaba que existía una superficie cubierta por lirio cercana a las 150,000 has, siendo los estados de Jalisco, Veracruz, Tabasco e Hidalgo los que presentaban el mayor problema con más de 75 000 ha (Gómez & Cárdenas, 2000). Se han registrado problemas por lirio acuático en los estados de Aguascalientes, Baja California Norte, Coahuila, Campeche, Chiapas, Colima,

Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz (Juárez, 2011) (ver figura 11). Así, *E. crassipes*, ocupa el puesto número ocho entre las diez malezas más invasivas del mundo (Arteaga et al., 2010) y es considerada la maleza acuática que acarrea mayores problemas ambientales (Gopalakrishnan et al., 2011).



Figura 10. Distribución de las plantas acuáticas invasoras en México.

Fuente: Juárez, 2011.

1.12.1 Clasificación taxonómica y morfología de la especie

El lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) es una planta hidrófita libre flotadora que pertenece a la familia de las Pontederiaceae (Malik, 2007). De acuerdo al departamento de agricultura de los Estados Unidos en la base de datos de plantas registradas y secuenciadas (USDA, 2010), taxonómicamente puede clasificarse como se indica en la tabla 3. El lirio acuático se caracteriza por su tolerancia a climas extremos, invade los cuerpos de agua con facilidad, debido al tipo de

dispersión (a través de propágulos) que desarrolla, y es capaz de duplicar su biomasa cada 6-18 días, dependiendo de las condiciones ambientales (CONABIO, 2012).

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *E.crassipes*.

Reino	<i>Plantae</i>
Phylum	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Liliopsida</i>
Orden	<i>Pontederiales</i>
Familia	<i>Pontederiaceae</i>
Género	<i>Eichhornia</i>
Especie	<i>Eichhornia crassipes</i>

El lirio acuático es una planta perene, que posee hojas de color verde brillante, espigas florales de color violeta o amarillas y una raíz fibrosa (figura 12) que puede llegar a medir hasta 3 m de largo (Secretaría de agricultura, 2016). Los pecíolos son los tallos de las hojas y los estolones son las estructuras que generan nuevos individuos. Las inflorescencias poseen entre 8 y 15 flores. Los frutos son unas pequeñas cápsulas que contienen alrededor de 450 semillas (Juárez, 2011).

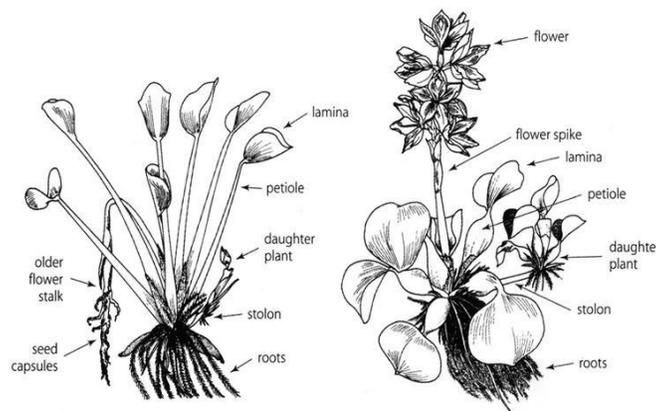


Figura 11. Morfología de *E.crassipes*.

Fuente: Juárez, 2011.

Capítulo II. Metodología

Este trabajo forma parte del proyecto “Obtención de bioetanol a partir de residuos de frutas de mercados municipales” que se desarrolla en el Instituto Tecnológico de Villahermosa. El procedimiento metodológico se realizó en colaboración con el Instituto Tecnológico Superior de Comalcalco en las instalaciones del laboratorio de Análisis Instrumental.

2.1 Determinación de los puntos de muestreo

Se seleccionaron dos puntos de colecta de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) en las orillas del Río Seco pertenecientes a la zona urbana del municipio de Comalcalco, Tabasco ubicados en la calle Mariano Arista, cuyas coordenadas son 18°15.767´ Norte, 0.93°13.201´ Oeste. Los puntos se determinaron tomando en consideración la abundancia de la especie y la accesibilidad al sitio para realizar la colecta.

2.1.1 Muestreo

Se tomaron tres muestras de aproximadamente 1 kg de lirio fresco en etapa adulta, recolectando las plantas más cercanas a la orilla, las cuales se trasladaron de forma inmediata en bolsas de polietileno cerradas, al laboratorio del Instituto Tecnológico Superior de Comalcalco donde se lavaron con suficiente jabón y agua para retirar todos los residuos presentes. Una vez limpio se realizó la separación de los peciolo, tallos y raíz, seleccionando los tallos para el procesamiento que consistió en su reducción de tamaño mismos que se cortaron de forma manual con cuchillos convencionales a tamaños de partícula de 1 cm para facilitar la deshidratación (Ortíz, 2008).



Figura 12. Macrolocalización del sitio de muestreo.

2.2 Pretratamiento de la materia prima

Por su composición química, la biomasa lignocelulósica es muy diferente de los productos con alto contenido de azúcares o almidón. La estructura de estos materiales, compuesta fundamentalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, hace que los procesos para la obtención de biocombustibles deban ajustarse de acuerdo a las características de estos componentes haciendo necesaria la implementación de una etapa previa de pretratamiento para poder conseguir fracciones hidrolizables para la obtención de azúcares que posteriormente puedan ser fermentadas (Abril & Abril, 2008).

2.2.1 Determinación de pH en fresco

Para este procedimiento se empleó la norma mexicana NMX-AA-25-1984 que hace referencia a la determinación del pH de residuos sólidos por el método potenciométrico. Para lo cual se calibró el potenciómetro con soluciones amortiguadoras pH=4, pH=7 y pH=11. Posteriormente se pesaron 10 g de muestra mismos que se transfirieron a un vaso de precipitado de 250 ml y se añadieron 90 ml de agua destilada, la solución se mezcló mediante agitación continua durante 10 minutos y se dejó reposar por 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se

sumergió el electrodo en la solución y se tomó el valor de pH registrado en la pantalla del dispositivo, el procedimiento se realizó por triplicado.

2.2.2 Determinación de humedad

Una vez finalizado el corte del lirio, se separó en sobres de papel estraza que contenían 200g de lirio seco y se introdujeron al horno de secado a 70°C durante cuatro horas, posteriormente se colocaron en un desecador de cristal durante 30 minutos para evitar la absorción de humedad y se pesaron en una balanza digital, el proceso se repitió hasta alcanzar peso constante.

El lirio seco se colocó en un triturador convencional marca Bella, durante 3 minutos para obtener partículas finas, mismas que se separaron por tamaño haciéndose pasar por cuatro tamices, los tamaños de apertura de los mismos se especifican en la tabla 4.

Tabla 4.Características de los tamices.

# de Tamices	Apertura (μM)
6	3,360
10	2000
20	841
40	420

2.2.3 Determinación de nitrógeno total

La determinación de N_{total} se realizó mediante la técnica de Kjeldal, para lo cual se pesó una muestra de 0.1 g de lirio acuático seco en una balanza analítica y se depositó en un matraz Kjeldahl, se le añadieron 2 g de sulfato de cobre, 10 g de sulfato de sodio anhidro, 25 ml de ácido sulfúrico y unas perlas de ebullición.

El matraz se colocó en el digestor y se calentó cuidadosamente a baja temperatura hasta alcanzar la carbonización de todo el material, una vez realizado este procedimiento, se aumentó gradualmente la temperatura hasta alcanzar la clarificación de la solución, misma que se dejó enfriar y se le adicionaron 400 ml de agua destilada para disolver por completo la muestra. Posteriormente se agregaron 3 gránulos de zinc y 50 ml de hidróxido de sodio

1:1, inmediatamente se conectó el matraz a un sistema de destilación con salida a otro matr az erlenmeyer que contenía 50 ml de de ácido bórico y dos gotas de reactivo Shiro Tashiro como indicador. El destilado se titul  con ácido clorhídrico 0.1 N a goteo y agitación constante hasta observar el viraje del color del indicador de violeta a verde. El % de Nitrógeno se calculó mediante la ecuación 1.

Ecuación 1

$$\% \text{ de N} = \frac{(\text{ml del ácido valorante} - \text{ml del blanco}) \times N \text{ del ácido} \times 0.014 \times 100}{\text{Peso de la muestra en g}}$$

2.2.3.1 Preparación de indicador universal Shiro Tashiro

El indicador universal se preparó pesando 0.5 g de verde de bromocresol y 0.1 g de rojo de metilo los cuales se mezclaron y disolvieron con alcohol etílico al 96% y se aforó a 100 ml.

2.3 Hidrólisis  cida

La hidrólisis es una reacción química donde ocurre la ruptura de la molécula del agua. Para evaluar las condiciones de reacción adecuadas, se estableció un diseño experimental simple (tabla 5), en el cual se consideraron cuatro concentraciones experimentales de 10, 15, 20 y 25 % de ácido sulfúrico, cada una con cuatro repeticiones, el diseño se replicó cuatro veces, los datos obtenidos se analizaron con el software estadístico Statgraphics 16.

Tabla 5. Diseño experimental.

Concentraciones experimentales de H ₂ SO ₄	Tratamientos			
10%	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄
15%	X ₂₁	X ₂₂	X ₂₃	X ₂₄
20%	X ₃₁	X ₃₂	X ₃₃	X ₃₄
25%	X ₄₁	X ₄₂	X ₄₃	X ₄₄

El procedimiento de hidrólisis se realizó siguiendo la técnica de Tejeda (2009) modificada. Para lo cual se agregó 1 g de lirio seco y tamizado en matraces de balón y se adicionaron 20 ml de ácido sulfúrico a las concentraciones de prueba, las muestras se calentaron a 121°C a reflujo en un baño de aceite vegetal, para controlar la reacción se usó una torre de enfriamiento rápido (figura 16). Al término de la reacción, el hidrolizado se dejó enfriar y se hizo pasar a través de filtros papel celulosa Whatman No. 2, posteriormente se ajustó el pH a 7 con NaOH 5N y se refrigeró para su conservación.



Figura 13. Equipo de hidrólisis.

2.3.1 Determinación de azúcares reductores

El contenido de azúcares reductores en los jarabes hidrolizados se evaluó utilizando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) conocido también como método de Miller. Para la determinación se agregó 1 ml de reactivo DNS en diferentes tubos de ensaye, a los que posteriormente se les adicionó 1ml de jarabe glucosado, los tubos se sometieron a calentamiento en baño maría durante 20 min.

Una vez finalizado el tiempo de reacción, las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, para posteriormente agregar 8,0 ml de agua destilada y se procedió a su lectura en el espectrofotómetro UV-VIS Marca HACH, modelo DR-6000 (figura 14) a una longitud de onda de 575 nm.



Figura 14. Espectrofotómetro UV-VIS Marca Hach.

2.3.1.1 Preparación del reactivo DNS

El reactivo DNS se preparó disolviendo 2.5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, 2.5 g de NaOH, 0.125 g de Na_2SO_4 y 0.5 g de fenol en 200ml de agua destilada. Se aforó a 250 ml y la solución se depositó en un frasco ámbar para su conservación a 8 °C.

2.3.1.2 Preparación de curva patrón

La calibración analítica se realizó mediante un modelo de línea recta que consistió en encontrar la recta de calibrado que mejor ajuste a una serie de puntos experimentales. Para realizar la curva patrón, se preparó una solución madre de Dextrosa con una concentración de 1.0 g/L, para su elaboración se disolvieron 0.1 g de dextrosa en 90 ml de agua destilada y se aforó a 100 ml, a partir de esta solución se prepararon 10 tubos con concentraciones diferentes y un testigo sin dextrosa como indica la tabla 6. Una vez realizadas las diluciones, los tubos se colocaron a baño maría durante 20 minutos y posteriormente se leyeron en el Espectrofotómetro UV-VISIBLE a 575nm.

Tabla 6. Soluciones patrón para determinación azúcares reductores.

Tubo	Dextrosa (g)	H₂O (ml)	DNS (ml)
Testigo	0	3.0	3.0
1	0.3	2.7	3.0
2	0.6	2.4	3.0
3	0.9	2.1	3.0
4	1.2	1.8	3.0
5	1.5	1.5	3.0
6	1.8	1.2	3.0
7	2.1	0.9	3.0
8	2.4	0.6	3.0
9	2.7	0.3	3.0
10	3.0	0	3.0

2.4 Fermentación

Para realizar el proceso de fermentación se utilizó la levadura comercial Tradi-pan considerando el resultado de trabajos previos con esta levaduras realizados en el laboratorio de Microbiología e Investigación del Instituto Tecnológico de Villahermosa que demuestran que las levaduras de la marca Tradi-pán presentan buen crecimiento (Ruiz, 2014).

2.4.1 Activación de levaduras

Con una espátula previamente esterilizada, se agregó 1 g de levadura en un tubo de ensaye con 9 ml de agua destilada estéril, el cual se agitó hasta homogeneizar y se colocó en un termobañó a 30°C durante un periodo de 30 min para su activación. La muestra activada se incubó a 35 °C y se observó el crecimiento a las 24 h.

2.4.2 Aislamiento de levaduras

Posterior al periodo de incubación, se realizó el aislamiento de las levaduras en condiciones asépticas en cajas Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) cuya composición se detalla en la tabla 7. Para su elaboración se suspendieron 39 g del medio de cultivo en un litro de agua destilada, el preparado se calentó agitando

frecuentemente hasta clarificar y se esterilizó en un autoclave por 15 min a 15 lb/pulg² de presión y 121 °C.

Tabla 7. Componentes del medio de cultivo PDA.

Fórmula	Cantidad
Infusión de papa de 200 g	4 g
Dextrosa	20 g
Agar	15g

2.4.2.1 Resiembra y conservación de levaduras en tubo

Las colonias aisladas fueron resembradas en tubos inclinados con medio PDA, utilizando la técnica de estría en superficie. Tomando una porción pequeña de la colonia se resembraron tubos de PDA por triplicado, los cuales se incubaron a 35° C por 24-48 horas, posterior a su crecimiento los cultivos se conservaron en refrigeración.

2.4.2.2 Morfología microscópica de las levaduras

Para conocer la morfología de los microorganismos y verificar su activación, se procedió a la observación microscópica, realizando una suspensión de las levaduras en agua destilada estéril en un portaobjetos, a la cual se le agregaron 2 gotas de azul de metileno con la finalidad de proporcionar contraste, posteriormente se colocó un cubreobjetos sobre la suspensión y se realizó la observación en un microscopio Carl Zeiss con el objetivo de 40X.

2.4.2.3 Cuantificación celular

El crecimiento poblacional se determinó por densidad óptica (DO) que de acuerdo a la capacidad de absorción de la luz puede ser expresada como Absorbancia mediante espectrofotometría de luz UV o luz visible (Olivas, 2012). La suspensión microbiana se preparó disolviendo una colonia aislada en 10 ml de agua estéril, transcurridos 5 min de reposo, el concentrado celular se leyó en el espectrofotómetro UV-VIS a 640nm.

2.4.2.4 Preparación de curva patrón

Para realizar la curva patrón se preparó una solución madre con una concentración de 1.0 g/L de levadura, para su elaboración se disolvieron 0.1 g de levadura en 90 ml de agua destilada estéril y se aforó a 100 ml, a partir de esta solución se prepararon 3 tubos con concentraciones diferentes y un testigo sin microorganismos (tabla 8).

Tabla 8. Soluciones patrón para cuantificación de levaduras.

Concentración porcentual de levaduras	Suspensión	
	de levaduras (ml)	Agua destilada (ml)
0	0	10
10	1	9
50	5	5
100	10	0

2.4.3 Preparación del inóculo

Para realizar la suspensión de levaduras se preparó un medio enriquecido con peptona al 0.5%, dextrosa al 0.5% en un matraz que contenía 100 ml de agua destilada, la solución se esterilizó por el método de calor húmedo en autoclave durante 15 min a una presión de 15 lb/pulg² y temperatura de 121 °C, para obtener rangos óptimos de pH, se agregó ácido tartárico en solución a goteo hasta alcanzar valores de 4.5, posteriormente se adicionó 0.3 % de extracto levadura. La suspensión se colocó en un termobañó a 30 °C y agitación continua durante 16 h.

2.4.3.1 Inoculación de jarabes glucosados

El proceso fermentativo se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por (Espinoza, 2015) con modificaciones a la técnica, donde se plantea el enriquecimiento de los jarabes glucosados mediante la adición de fosfato de amonio, ya que este permite que las levaduras encuentren una fuente nutricional

adecuada y de esta forma su metabolismo pueda realizar el proceso de conversión de los azúcares en alcoholes. Para ello se agregaron 0.002g/ml de fosfato de amonio por cada 100 ml de jarabe mismos que se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 15 lb/pulg² de presión a 121 °C y posteriormente se adicionaron 4 ml de la suspensión de microorganismos. Se evaluaron dos jarabes glucosados con tres réplicas. El proceso se monitoreó durante cuatro días.

2.5 Cinética de reacción

Posteriormente a la inoculación, se tomaron 5 ml de jarabe con una pipeta estéril y en condiciones asépticas y se procedió a la determinación de alcoholes mediante espectrofotometría UV-VIS, el procedimiento se repitió cada 24 h durante 96 h.

2.5.1 Determinación cuantitativa de alcoholes

Para la determinación cualitativa de alcoholes se empleó el método de oxidación con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), para lo cual se preparó una solución madre disolviendo 11.3 g de dicromato de potasio en 440 ml de ácido sulfúrico y se aforó a 1L con agua destilada. A partir de la solución madre se realizó una curva patrón de $K_2Cr_2O_7$, empleando alcohol de 96°G.L y agua destilada, se prepararon 10 tubos con diferentes concentraciones como se detalla en la tabla 9.

Tabla 9. Soluciones patrón para determinación de etanol

Tubo	Concentración (v/v)	Etanol (ml)	Agua (ml)	Solución de $K_2Cr_2O_7$ (ml)	Agua (ml)
1	0	0	0	2	7
2	0.1	0.1	0.9	2	7
3	0.2	0.2	0.8	2	7
4	0.3	0.3	0.7	2	7
5	0.4	0.4	0.6	2	7
6	0.5	0.5	0.5	2	7
7	0.6	0.6	0.4	2	7
8	0.7	0.7	0.3	2	7
9	0.8	0.8	0.2	2	7
10	0.9	0.9	0.1	2	7

2.6 Cálculo de rendimiento de sustrato y productos

Los rendimientos de biomasa y de producto son parámetros muy importantes ya que representan la eficacia de conversión del sustrato en biomasa y productos. Para realizar este cálculo se determinó la cantidad de producto formado y el sustrato consumido durante el tiempo de la reacción a partir de las ecuaciones 2 y 3.

Ec. 2.

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

Donde:

$Y_{x/s}$ = Rendimiento del sustrato respecto al tiempo

ΔX = Diferencia de tiempo

ΔS = Consumo del sustrato

Ec. 3

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$$

Donde:

$Y_{p/s}$ = Rendimiento del producto respecto al sustrato

ΔP = Incremento del producto

ΔS = Consumo del sustrato

CAPITULO III. Resultados y Discusión

3.1 Pretratamiento de la materia prima

3.1.1 Determinación de pH

En las tres corridas experimentales el pH se encontró en rangos cercanos a la neutralidad, se puede observar que los valores oscilan entre 7.01 y 6.93 (ver figura 15), lo que refleja que la diferencia entre las tres corridas no es significativa, siendo el valor del pH promedio de 6.91 (ver tabla 10).

Tabla 10. Valores de pH en fresco.

Muestra	pH en fresco
1	7.01
2	6.93
3	6.81
Promedio	6.91

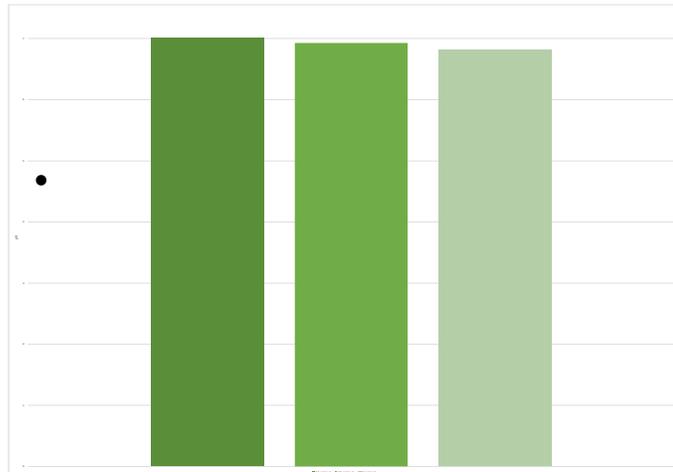


Figura 15. Valores de pH de lirio fresco

El pH en las plantas ejerce un efecto sobre la disponibilidad de nutrientes como resultado de su impacto en la solubilidad de diferentes compuestos, si este se encuentra fuera de los rangos óptimos para cada especie, puede sufrir la insuficiencia de cationes o aniones, en cambio si es excesivamente ácido puede indicar la carencia de algún elemento con carga positiva como Ca^+ , Mg^+ ó K^+ , en cambio si el pH es alcalino puede faltar algún anión como N, P, S (Sierra et al., 2014). El lirio acuático al estar cercano a los rangos de neutralidad se infiere no presenta carencias nutrimentales, aunado a eso, su alta resistencia a medios hostiles le confiere la capacidad de mantener gradientes de pH idoneos para su crecimiento y propagación.

3.1.2 Determinación de humedad

En el procedimiento de secado se encontró que a partir de 12 h de exposición al calor, el lirio fresco se deshidrata y su peso comienza a permanecer constante (ver figura 16). De acuerdo a Geankoplis (1998) esta es una de las operaciones unitarias más comunes ya que permite la preservación tanto de nutrientes como de elementos estructurales en las especies vegetales.

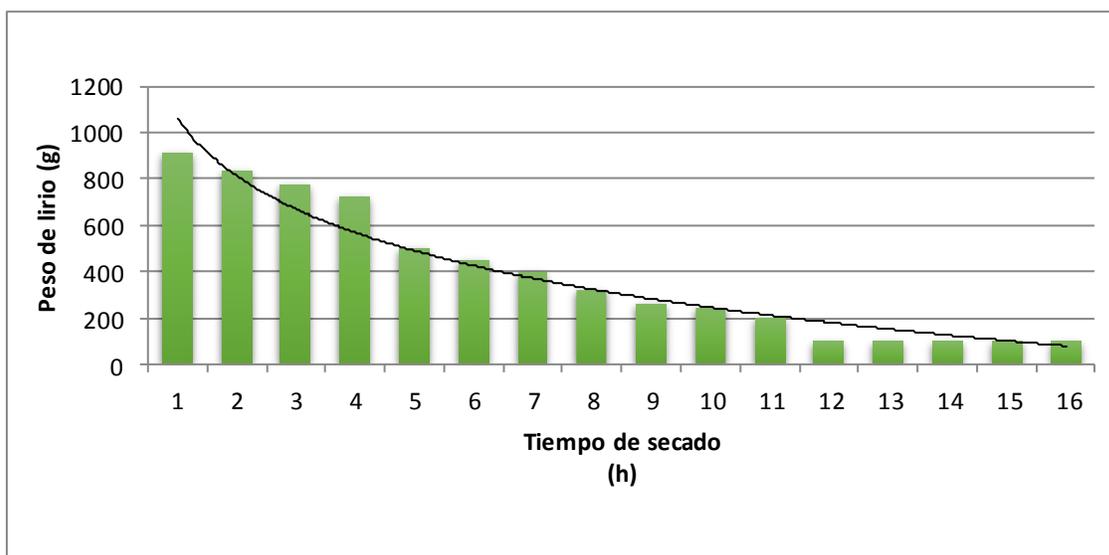


Figura 16. Secado de lirio acuático.

Se observa que después de un corto período de estabilización, la velocidad de evaporación aumenta, a medida que transcurre el tiempo se registra una etapa de velocidad de secado que no muestra diferencias marcadas en el peso del lirio acuático durante las primeras cuatro horas, a partir de ahí, se produce una reducción importante del contenido de agua, mientras la superficie del sólido se mantiene saturada, esta migra desde el interior a la misma velocidad que ocurre la evaporación en la superficie, permitiendo que a partir de las cinco horas de exposición al calor se produzca un descenso marcado, pero al llegar a las 12 h de secado, el gradiente de agua permanece constante. Barbanti (1994) demostró que la simultaneidad de la transferencia de calor y masa acompañada de un cambio de

fase, durante este proceso se disminuye la actividad de agua y, con ello se favorece la degradación bioquímica de componentes en procesos posteriores.

Los resultados obtenidos en la determinación de humedad (ver tabla 11) demuestran que el peso del lirio seco corresponde en su mayoría al contenido de agua presente el cual es equivalente a 89.67 %, de manera similar Atehortua & Gartner (2013) reportan que el lirio acuático seco contiene humedad equivalente al 90%, estos resultados se aproximan a lo descrito por Harun et al (2011) quienes encontraron que esta misma planta contiene alrededor de 95% de humedad.

Tabla 11. Contenido de humedad.

Repeticiones	Peso Inicial (g)	Peso final (g)	Pérdida de agua (g)	% humedad
1	910	100	810	89.01
2	1,000	100	900	90.0
3	1,000	100	900	90.0
Pérdida de peso promedio: 870 g				
% de humedad promedio: 89.67				

Además de la estructura esponjosa del lirio acuático, otra causa del alto contenido de agua es la presencia de los grupos hidroxilo en su estructura los cuales posibilitan la formación de enlaces de hidrógeno. En otros materiales lignocelulósicos estudiados como el sorgo dulce, se ha determinado que el contenido de humedad presenta un porcentaje de 72.31% en tallo. Eso tiene relación directa con el alto nivel higroscópico del tallo, así como el nivel de porosidad de las partículas de absorción que presentan entre 70 y 80% de humedad (Chanta, 2015). De igual manera otros sustratos como la cascara de naranja estudiadas por Alvear et al (2009) contienen 69.35% de humedad.

Posterior al proceso de secado y molienda, el material obtenido se cribó en cuatro tamices de apertura chica, en la tabla 6 se muestran las características de cada uno. De los 100 g de lirio seco obtenido en el proceso de eliminación de humedad y después del cribado se obtuvieron los datos que se presentan en la tabla 12.

A pesar de que el rendimiento de materia seca apreciable es bajo, el ciclo de reproducción de *Eichhornia crassipes* permite la generación de nuevas plantas en periodos cortos de tiempo, lo cual permite el abastecimiento de la materia prima. Gómez et al., (2012) demostró que especies forestales como *Eucalyptus camaldulensis* y *Tereticornis* presentan rendimientos volumétricos de biomasa altos y turnos de crecimiento cortos como para garantizar un suministro rápido y constante de biomasa lignocelulósica para ser empleada como materia prima en un proceso de producción de biocombustibles.

Tabla 12. Retención de partículas.

# de Tamiz	Apertura de malla	Peso de la materia retenida (g)
6	3360	0
10	2000	0
20	841	1.5
40	420	31.6
		Total 33.1 g

Se retiró un porcentaje de partículas que se obtuvo fue de 33.1 las cuales eran de tamaño < a 400 μm .

3.1.4 Determinación de Nitrógeno

El porcentaje de Nitrógeno encontrado en el lirio acuático seco es de 1.12, Viana (2012) comparó las características de componentes elementales de tres especies arbóreas para uso como biocombustibles, encontrando que el porcentaje de Nitrógeno oscila alrededor de 0.6%. Por otra parte D'Água et al (2015) reportaron que los residuos de poda y el aserrín usados como sustrato para elaborar biocombustibles presentan 1.10% y 1.44% de Nitrógeno respectivamente.

3.2 Hidrólisis ácida

3.2.1 Curva de calibración de DNS

La curva de calibración presenta un coeficiente de correlación de 99.8% y R-cuadrada de 0.998, lo que muestra la linealidad del equipo en función a la concentración de analito (figura 17), esto puede garantizar la buena exactitud y

confiabilidad estadística. Es posible observar que a medida que aumenta la concentración del ácido, también aumenta el valor de la absorbancia, el análisis de datos realizados permite establecer la ecuación 4.

Ec. 4

$$\text{Concentración de azúcares reductores} = 1380,2 (\text{absorbancia}) + 101,8$$

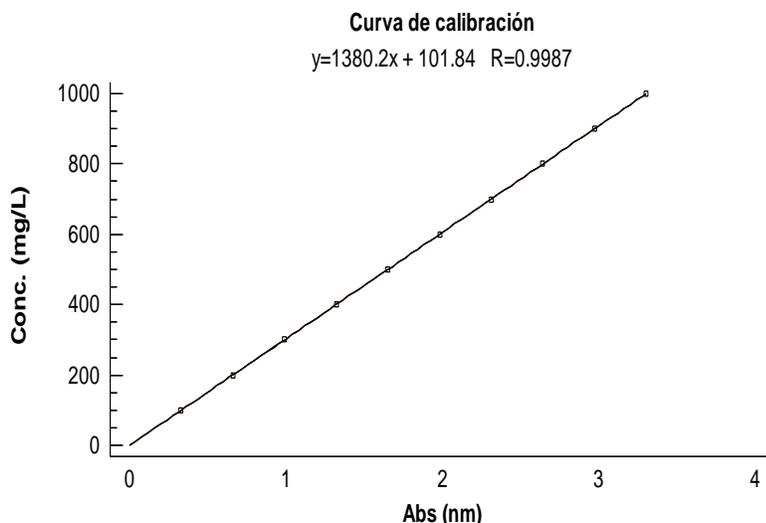


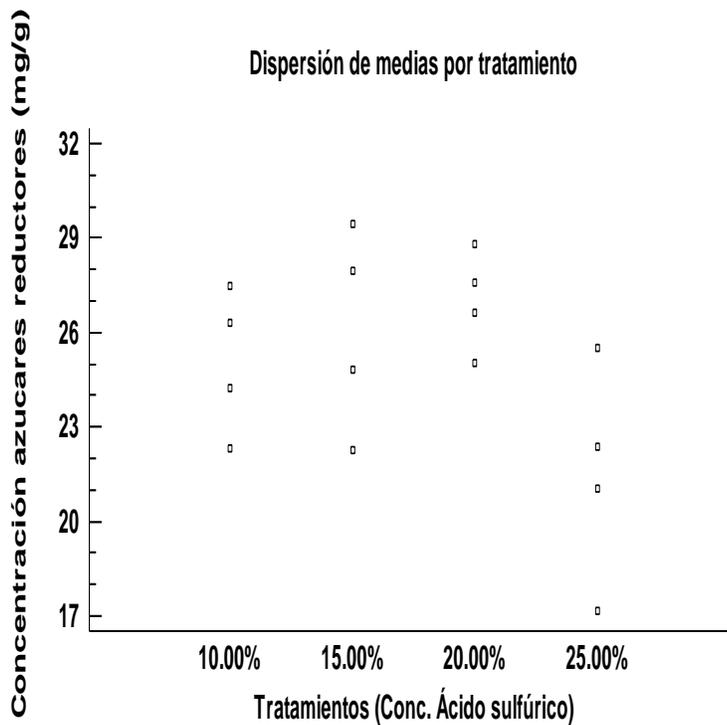
Figura 17. Curva de calibración.

3.2.2 Caracterización de los jarabes glucosados

En la tabla 14 se presentan los promedios de azúcares reductores obtenidos, ordenados de acuerdo al diseño experimental propuesto. En la figura 18 se aprecia la dispersión de medias por tratamiento, se observa que conforme aumenta la concentración de ácido sulfúrico también aumentan las concentraciones de azúcares liberados, en los tratamientos de 25 y 20% es donde se observa que los azúcares reductores presentan mayor concentración, pero al aumentar la cantidad de ácido a 25%, se reduce de forma marcada la concentración de azúcares reductores. Así mismo es posible observar que entre los tratamientos de 10 y 25 % de ácido es notable la baja concentración de azúcares.

Tabla 13.Concentración de azúcares reductores por tratamiento y sus medias.

Concentración de azúcares reductores (mg/g)				
Tratamiento.	Repeticiones			
	1	2	3	4
10%	27.48	26.29	24.22	22.32
15%	29.43	27.97	24.81	22.27
20%	28.79	26.63	27.59	25.01
25%	21.02	17.15	22.39	25.51



El análisis de varianza de una vía, indicó diferencia significativa entre las medias de concentración de azucares (mg/ml), respecto a los volúmenes de ácido evaluados (10,15, 20 y 25%) con un 95% de confiabilidad ver tabla 15.

Tabla 14. ANOVA de una vía (Azúcares reductores & Ácido Sulfúrico)

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	208.859	3	69.6198	3.17	0.0335
Intra grupos	966.889	44	21.9747		
Total (Corr.)	1175.75	47			

3.2.4 Prueba de Tukey

La prueba de rangos múltiples de Tukey evaluada al 95% de confianza muestra los tratamientos que presentan diferencias significativas, en la tabla 16 se observa la agrupación de letras iguales indica que no existe diferencia significativa entre las medias y las letras distintas señalan que si existe diferencia significativa entre los valores , también se observa que la máxima concentración de azúcares reductores es de 27.009 mg/g y corresponde al tratamiento que contiene concentración de ácido sulfúrico de 20%, sin embargo, en el tratamiento con concentración de 25% se identifica un efecto inhibitorio Lo cual se puede asociar con la reacción de degradación que sufren los azúcares, que puede atribuirse a la saturación que ejerce el ácido.

Tabla 15. Comparación de medias (método Tukey).

Concentración	N	Media	Agrupación
20%	12	27.006	A
15%	12	26.09	Ab
10%	12	25.08	Ab
25%	12	21.52	B

El tratamiento evaluado a 20% de ácido sulfúrico muestra una tendencia mayor a la liberación de azúcares reductores con una media de 27.006, seguido de los tratamientos de 15 y 10% quienes presentan medias con valores de 26.09 y 25.08 respectivamente, en contraste con el tratamiento de 25% que refleja valores de 21.52 (ver figura 19).

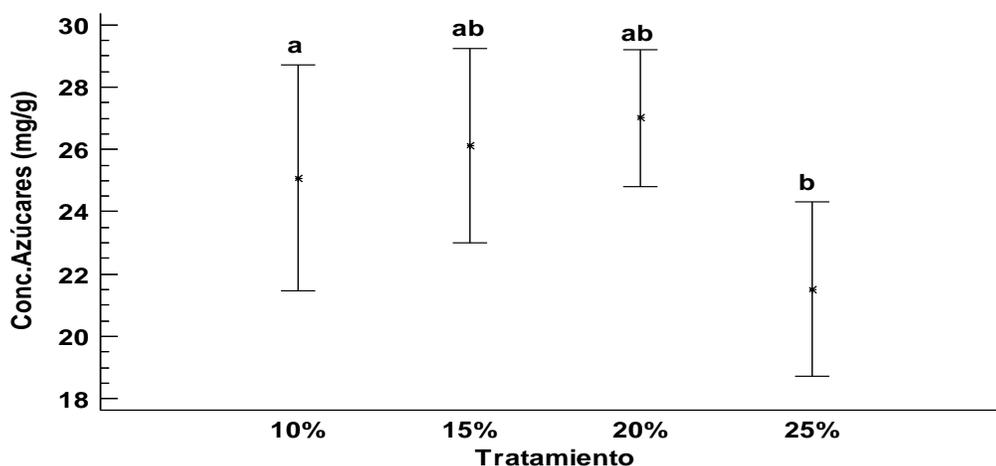


Figura 19. Prueba rangos múltiples de Tukey.

Morales de la Rosa (2015) demuestra que el ácido sulfúrico funciona bien con tratamientos hidrolíticos debido a su carácter de ácido fuerte, así mismo permite que la glucosa aumente de forma lineal al aplicarle concentraciones altas del mismo. Sin embargo, al utilizar a concentraciones muy altas de ácido el rendimiento de los azúcares especialmente la glucosa comienza a disminuir rápidamente debido a la formación de 5-hidroximetil-furfural y de continuar la reacción puede llegar a transformarse en Ácido levulínico y Ácido fórmico. Esto puede explicar el comportamiento aparentemente distinto del tratamiento elaborado con 25% de ácido.

3.2.5 Verificación de los supuestos del modelo.

Antes de realizar el análisis de datos, se corroboró que el experimento cumpliera con los parámetros de asimetría y curtosis (ver tabla 14) donde se observa que los rangos se encuentran dentro de los parámetros establecidos en los postulados que indican que para considerar un experimento en condiciones normales los valores de sesgo deben encontrarse entre -2 a 2.

Tabla 16. Curtosis y simetría

Tratamientos	Rango	Sesgo	Curtosis
		Estandarizado	Estandarizada
10%	18.8	-0.199118	-0.385435
15%	15.55	-0.372866	-0.533228
20%	13.63	-0.873725	1.24537
25%	14.91	0.671654	-0.291509
Total	19.68	-0.50685	-1.06773

En la figura 20 se observa que la probabilidad normal de los puntos porcentuales presenta tendencia lineal próxima a la pendiente, el histograma refleja parámetros tendientes a la campana Gaussiana de distribución, los residuales no muestran anomalías. Por lo tanto, es posible analizar los datos experimentales mediante un análisis de varianza de una sola vía.

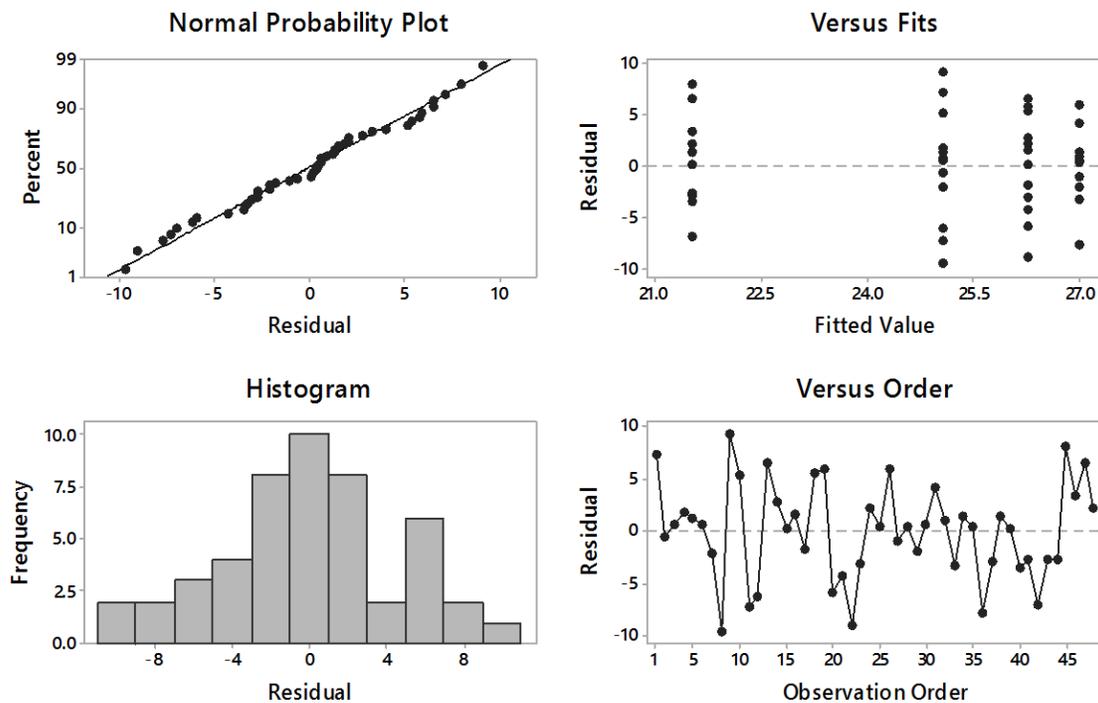


Figura 20. Asimetría y Curtosis.

3.3 Fermentación

3.3.1 Aislamiento de levaduras

Las colonias aisladas en cajas, presentaron características morfológicas como bordes enteros, color blanco opaco y consistencia cremosa. En la figura 21 se muestra el crecimiento de las levaduras.

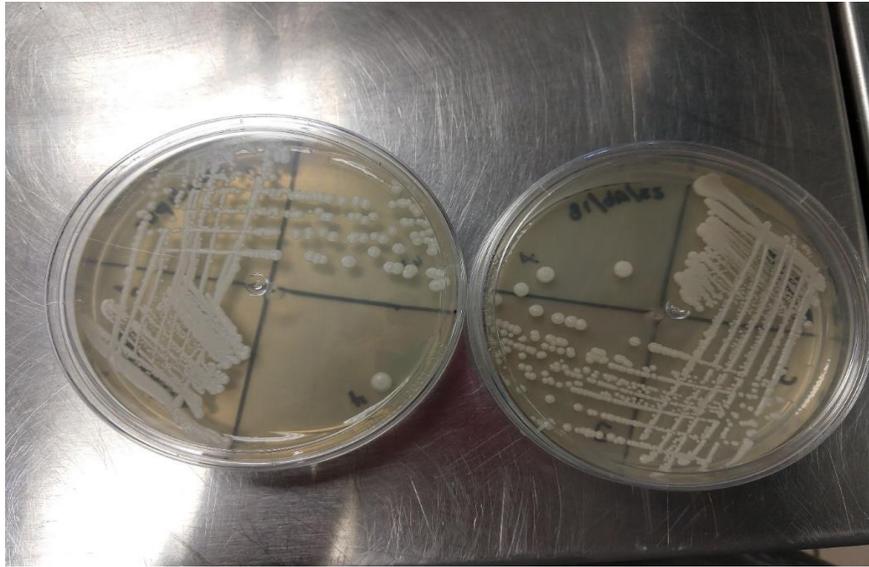


Figura 21. Aislamiento por estría cruzada de levadura Tradi-Pan.

3.3.2 Resiembra y conservación de levaduras en tubos

En la figura 22 se muestran la suspensión de levaduras utilizada y cultivadas en tubo para su purificación y conservación.



Figura 22. Crecimiento en tubo inclinado

3.3.3 Morfología microscópica de levaduras

En la observación microscópica (ver figura 23) se identificaron estructuras unicelulares con forma ovalada, algunas presentaban pequeños brotes o yemas.

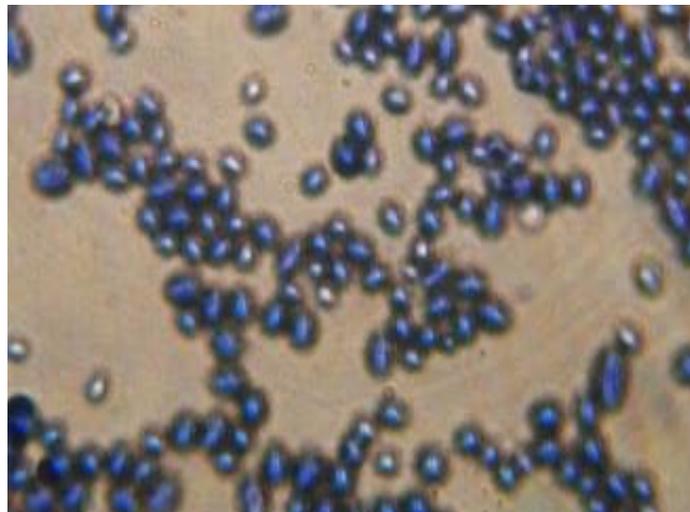


Figura 23. Morfología microscópica de levaduras.

3.3.4 Curva patrón para cuantificación de levaduras

La figura 24 muestra los resultados del ajuste lineal para describir la relación entre la concentración y la absorbancia. La ecuación 5 representa el modelo ajustado, mostrado como una línea sólida.

Ec. 5]

$$\text{Concentración de microorganismos} = 45.4545 + (472727 * \text{absorbancia})$$

Las cotas internas de la gráfica muestran los límites de 95.0% de confianza para la media de la concentración de las observaciones en valores dados de absorbancia. Las cotas externas muestran los límites de 95.0% de predicción para nuevas observaciones.

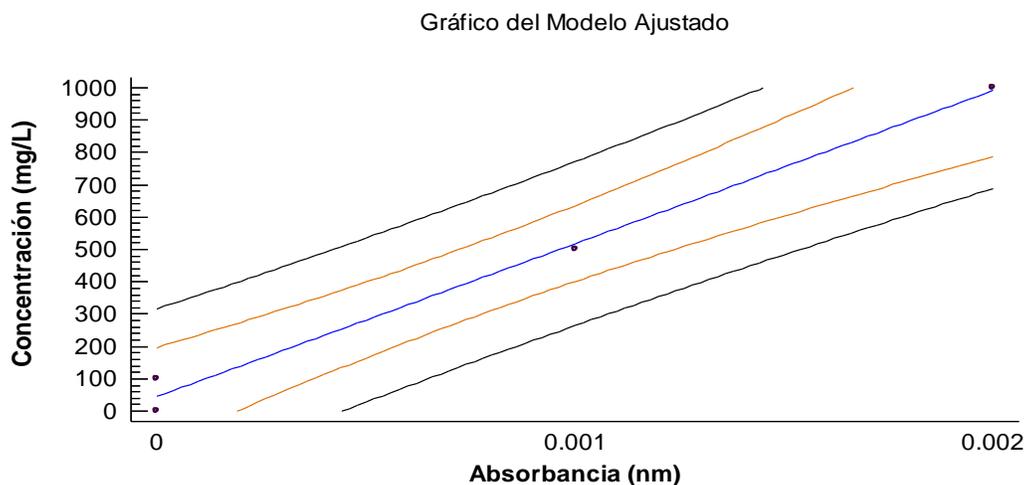


Figura 24. Curva de calibración para cuantificación de levaduras.

3.3.4.1 Cuantificación celular

En la tabla 18 se muestra concentración de levaduras resultantes de la sustitución de los valores de absorbancia en la ecuación 6, se puede observar que la concentración de microorganismos es de 109,245 levaduras/ml de suspensión.

Tabla 17. Descripción de cultivos.

I.D	Producto	Características del cultivo	Abs (nm)	Conc. M.O
0	Blanco	Medio sin microorganismos adicionados	0.000	0
1	Tradi- Pan	Presenta crecimiento abundante	0.231	109,245

3.3.5 Cinética de reacción fermentativa

La concentración de azúcares reductores monitoreada durante 96 h, se comporta de forma decreciente (tabla 19), lo cual indica que los microorganismos presentes en el inóculo metabolizan por la vía fermentativa las fuentes de carbono suministradas en el jarabe.

Tabla 18. Concentración de azúcares reductores en Jarabe Glucosado 1.

Jarabe 1			
Tiempo (h)	Réplica 1 mg/ml	Réplica 2 mg/ml	Réplica 3 mg/ml
0	1549.67	1549.67	1549.67
24	1393.67	1378.525	1210.141
48	685.66	640.118	598.72
96	311.63	322.67	234.33

En las primeras 24 h la disminución es poca, efecto que podría atribuirse a la adaptación del microorganismo al medio donde se encuentra, al transcurrir 48 horas se observa que la concentración de azúcares desciende pero no de manera significativa, pero al transcurrir 96 h la cantidad de azúcares reductores es muy baja, el comportamiento es similar en las tres réplicas (figura 25).

A diferencia de Rodríguez et al., (2017) que evaluaron la fermentación de jarabes glucosados elaborados a partir del aserín de pino y encontraron que la mayor concentración de azúcares se alcanzó entre las 24 y 48 h oscila entre 1.46 y 1.81 g de azucares/ l demostrandolo mediante pruebas LSD.

Tapiero (2016) demostró que con el uso de una cepa vínica especializada para producción de bebidas alcohólicas con bajos niveles de acidez es posible establecer que el incremento en la cinética de fermentación por parte de las levaduras puede presentarse entre 20,0% a 28,1%.

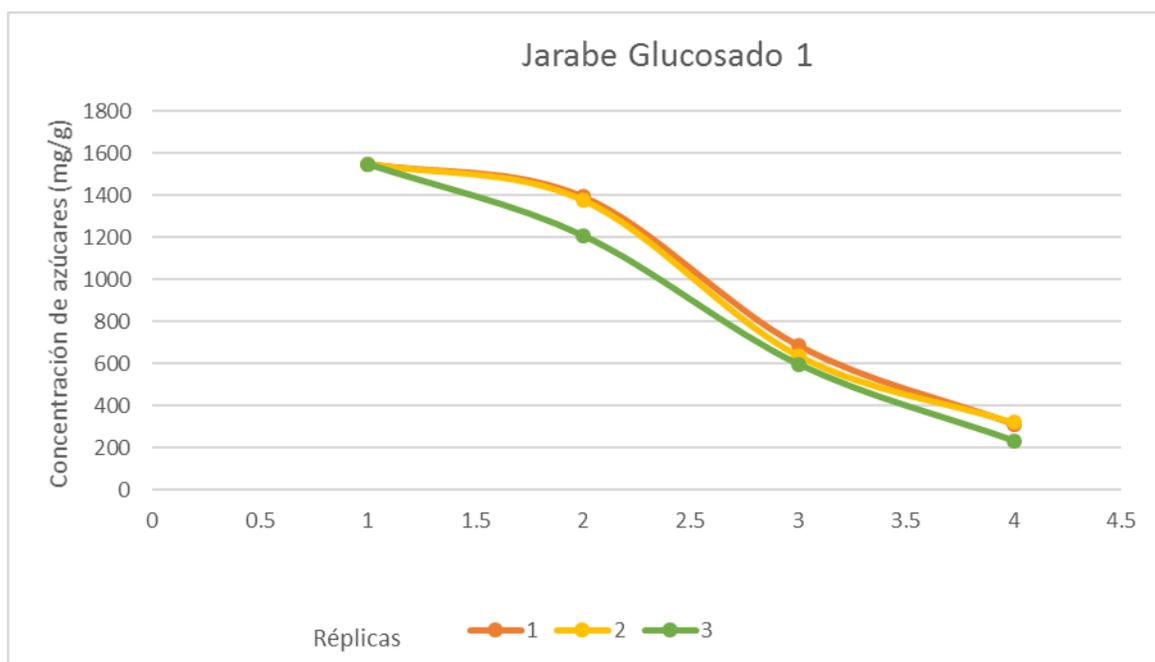


Figura 25. Cinética de consumo de azúcares en la fermentación de jarabe 1.

De manera similar, la segunda serie de experimentos ilustrada en la tabla 20 y figura 26 muestra un comportamiento decreciente en la concentración de azúcares reductores respecto al tiempo de fermentación, lo que permite reforzar que en transcurso de 96 h es posible que las levaduras consuman la mayor parte de los azúcares presentes en el jarabe.

Tabla 19. Concentración de azúcares reductores en Jarabe Glucosado 2.

Jarabe 2			
Tiempo (h)	Repetición 1 mg/ml	Repetición 2 mg/ml	Repetición 3 mg/ml
0	2104.51	2104.51	2104.51
24	1748.41	1752.55	1737.37
48	775.37	782.27	649.77
96	293.68	295.06	271.60

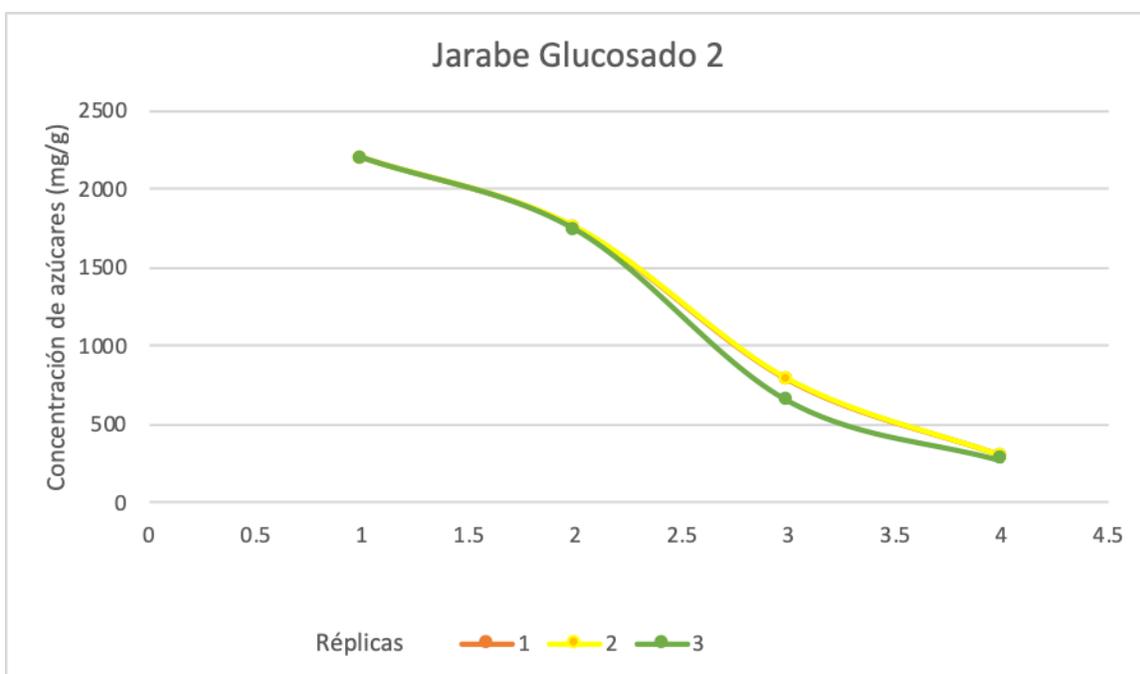


Figura 26. Cinética de consumo de azúcares en la fermentación del jarabe 2.

El periodo de fermentación para jarabes glucosados de lirio acuático (*E.crasipess*) fue de 96 h, es posible que este comportamiento se deba a la naturaleza de la materia prima. A diferencia de lo expuesto por Tejeda et al., (2014) donde al evaluaron tres tipos de cítricos se encontró que el tiempo de fermentación óptimo en todos los casos fue de 24 horas. En jarabes glucosados obtenidos a partir del pasto gramalote (*Paspalum fasciculatum*) se observó que los azúcares reductores se agotan casi en su totalidad a partir de las 36 h de reacción con *E.coli*

recombinante (Méndez, 2011). En contraste, jarabes glucosados evaluados con cepas recombinantes de *E.coli K011* demuestran que la máxima producción de etanol ocurre a las 96 h de haber iniciado la reacción y que para esta cepa, el consumo de los azúcares reductores se ve influenciado por la cantidad de nitrógeno presente (Leite et al., 2000). La hidrólisis de los residuos lignocelulósicos genera una mezcla de azúcares cuya fermentación presenta ciertas dificultades; las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) o bacterias (*Zymomonas mobilis*) convencionales no pueden fermentar fácilmente las mezclas de azúcares por lo que es necesario recurrir al empleo de microorganismos modificados genéticamente (Mesa et al, 2008).

3.4 Determinación cuantitativa de alcoholes

La figura 27 muestra los resultados de ajustar un modelo lineal (curva de calibración) para describir la relación entre la Concentración Etanol y los valores de absorbancia. Las cotas internas muestran los límites de 95.0% de confianza para la media de concentración etanol de múltiples observaciones en valores dados de Absorbancia. Las cotas externas muestran los límites de 95.0% de predicción para nuevas observaciones. El ajuste lineal permite calcular el coeficiente de correlación de 92.81%, el valor de R- Cuadrada= 0.928, y mediante la pendiente de la recta ajustada al modelo, se obtiene la concentración de etanol presente en los destilados (ecuación 7).

Ec. 6

$$\overline{\text{Concentración de EtOH}} = 3.5339(\text{Absorbancia}) + 0.1275$$

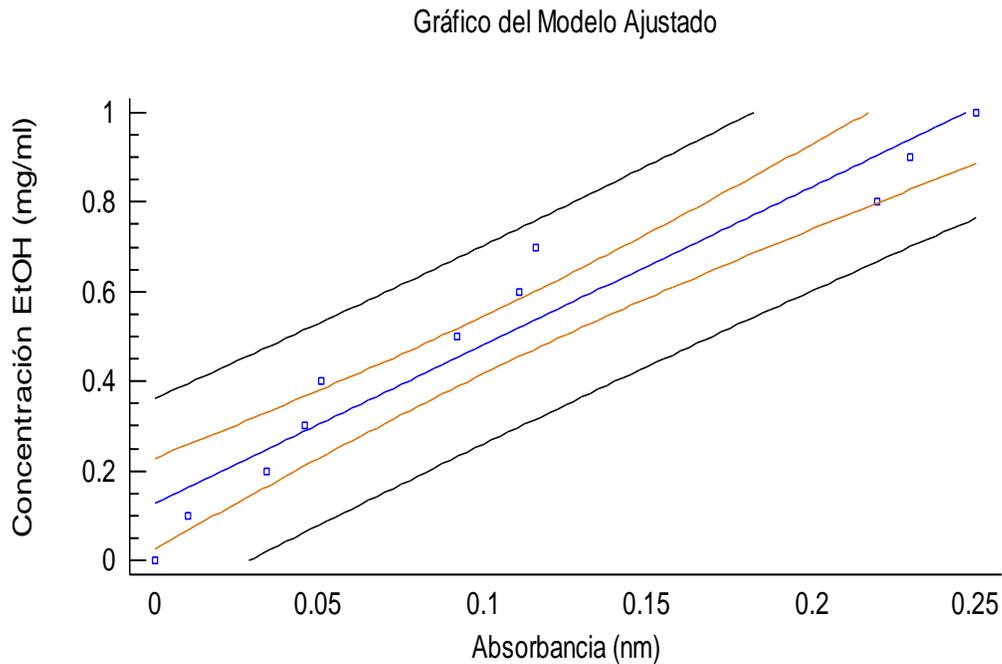


Figura 27. Curva de calibración para determinación de Etanol.

En la ecuación 7 se sustituyeron los valores de absorbancia de los destilados para determinar la concentración de alcohol presente en cada uno (ver tabla 21), se observa que el valor más alto de alcohol se presentó en el destilado 2 cuya concentración fue de 5.12 mg de etanol/ L de muestra destilada, la concentración más baja se presentó en el destilado 1 cuyo valor fue de 3.81 ml de etanol/ L de destilado. Así mismo es posible resaltar que a partir de 1g de lirio seco produce aproximadamente 1.12% de etanol.

Montaño (2014) demostró que al final de la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* de jarabes glucosados de *Moringa oleífera* pretatada mediante hidrólisis enzimática, la concentración de etanol fué de 6.92 g/l, al contrastar la concentración de etanol producido a partir de lirio acuático pretratado mediante hidrólisis ácida y fermentado con levadura comercial, se aprecia que los valores se encuentran ligeramente por debajo de lo producido con moringa.

Tabla 20. Concentración de alcohol.

Destilado	Abs (nm)	V _D (ml)	V _D (l)	Abs (nm)	Conc. (-OH) (mg/l)	% (OH)
1	1.049	400	0.4	1.049	3.81	0.95
2	1.415	390	0.39	1.415	5.12	1.31
3	1.193	390	0.39	1.193	4.34	1.10
4	1.187	380	0.38	1.187	4.30	1.13
%Promedio 1.12						

3.5 Rendimiento Teórico

En la reacción de conversión de glucosa a etanol (ver ecuación 8) un mol de glucosa produce 2 mol de etanol. Sin embargo, esto es lo que ocurriría si la reacción tuviera un rendimiento del 100%, pero en una situación real, no toda la glucosa se transforma en etanol, sino que un porcentaje se destina a la síntesis de las estructuras celulares y el mantenimiento de la célula.

A continuación, se presenta el balance masa de la reacción estequiometrica para la conversión de Glucosa en Etanol:



Ec. 7



Masa molecular de glucosa

C: 12.01g (6) = 72.06 g

H: 1.007 g (12) = 12.08 g

O: 15.99 g (6) = 95.99 g

Glucosa= 180.13 g/mol

Masa molecular de Etanol

C: 12.01 g/mol (2) = 24.02 g

H: 1.007 g/mol (6) = 6.04 g

O: 15.99 g/mol (1) = 15.99 g

Etanol= 46.05 g/mol

De acuerdo a las masas moleculares 189.13 g de glucosa producen 46.05 g de etanol, en base a esta relación estequiométrica se establece el siguiente análisis:

$$\frac{0.27009 \text{ g de Glucosa} \times 46.05 \text{ g de Etanol}}{180.13 \text{ g de Glucosa}} = 0.069 \text{ g de Etanol}$$

El rendimiento teórico indica que por cada 0.27005 g de glucosa se obtienen 0.069 g de etanol. Martínez (2008) mostró que el rendimiento estequiométrico para la transformación de xilosa o glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol.

$$\text{Rendimiento real} = \frac{80\% (0.069 \text{ g de Etanol})}{100\%} = 0.0552 \text{ g de Etanol}$$

Tejeda (2014) demostró que al realizar el balance de masa en la producción de etanol a partir de cascárea de frutas el rendimiento es bajo debido a que se requieren grandes pesos de estos residuos. A partir de las cáscaras de naranja se obtuvo 8,4 mg de etanol por cada gramo de cáscaras y a partir de las de piña, 1,0 mg de etanol por cada gramo.

Teniendo en cuenta que el etanol producido en la fermentación al final del proceso fue de 0.0552 g de etanol a partir de 1g de lirio acuático se puede considerar que su rendimiento se aproxima a lo reportado por Yang et al., (2009) donde el rendimiento de etanol para el pasto Switchgrass donde fue de 0,082 g/g.

Conclusiones

El presente trabajo mostró que el lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) puede considerarse una alternativa para la obtención de etanol a partir de materiales lignocelulósicos, principalmente por su predominante población en cuerpos de agua de Tabasco, así como por la rapidez en su ciclo de vida y reproducción. Dado que es posible obtener azúcares reductores de este tipo de biomasa, se abren nuevas posibilidades para su estudio.

Así mismo los resultados de los experimentos realizados mostraron que con el pretratamiento físico realizado a las plantas se logró adecuar muestras manipulables a nivel de laboratorio.

En el proceso hidrolítico de las muestras con concentraciones altas de ácido sulfúrico (25%), la producción de azúcares reductores sufre un decremento importante respecto a las demás, por lo que es deseable mantener condiciones que no sobrepasen ese límite.

De igual forma el tipo de cepa utilizada para realizar la fermentación influye sobre el rendimiento de etanol, en esta investigación se demostró que con la levadura comercial utilizada se logra la producción de 0.05520 g de etanol, equivalente al 1.12%.

Los resultados obtenidos en la caracterización del lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) abren paso al desarrollo e investigación de nuevas fuentes de materia prima para la obtención de azúcares fermentables a etanol. Por lo que se recomienda seguir estudiando esta línea ya que económicamente es menos costosa y más accesible.

Se recomienda además evaluar el rendimiento del sustrato mediante otros tipos de tratamientos hidrolíticos y realizar el proceso de fermentación con otros microorganismos que permitan obtener mayores concentraciones de alcohol.

Bibliografía

- Abril, D. R., & Abril, A. J. (2008). Etanol lignocelulósico. ¿Aditivo o sustituto para la gasolina? V Congreso Iberoamericano de investigación en celulosa y papel. Guadalajara, México.
- Alejandro, A., & Navarro, E. A. (2012). Etanol a partir de biomasa lignocelulósica (Vol. 1). Cuba: Aleta Ediciones.
- Alejos, C., & Calvo, E. (20 de Octubre de 2015). Biocombustibles de primera generación. *Revista Ingeniería Química*, 18, 19-30.
- Alessandrini, M., & Bolivar Ortíz, G. L. (2017). Biomasa y energía, antecedentes, retos y perspectivas. *Cintex(8)*, 61-63.
- Almenares Verdecia, J. F., & Serrat Díaz, M. (2008). Aspectos tecnológicos generales para la conversión a etanol de la biomasa lignocelulósica. *Tecnología Química*, 28(3), 63-70.
- Altomonte, H., Coviello, M., & Lutz, W. F. (2003). Energías renovables y eficiencia energética en América Latina y el Caribe: restricciones y perspectivas. Repositorio digital, Comisión económica para América Latina y el Caribe. Obtenido de <https://repositorio.cepal.org/handle/11362/6426>
- Álvarez Maciel, C. (Julio-Agosto de 2009). Biocombustibles: Desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Economía Informa UNAM(359)*, 64-88.
- Alvear, M., Castillo, C., Henao, D., Marimón, W., Tejada, C. N., Tejada, L., & Villabona, A. (2009). Estudio de la hidrólisis ácida de la naranja (*Citrus sinensis*) para la obtención de etanol. Cartagena de Indias, Colombia: Memorias del IV Simposio de Química Aplicada – SIQUIA 2009.
- Arellano, P. C. (2015). “Obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos sometidos a hidrólisis enzimática”. Tesis, Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas, Orizaba, Veracruz, México.

- Arteaga Pérez, L. E., Casas Ledón, Y., Cabrera Hernández, J., & Rodríguez Machín, L. (Abril de 2015). Gasificación de biomasa para la producción sostenible de energía. Revisión de las tecnologías y barreras para su aplicación. *Revista Afinidad LXXII(570)*, 138-145.
- Arteaga, C. J., Cuéllar, W., Ramírez, D., Giraldo, S., & Rios, S. (2010). Manejo de plantas acuáticas invasoras en embalses de epm. caso: buchón de agua (*Eichhornia crassipes*) en el embalse Porce II, Antioquia-Colombia. *Revista EMP*, 22-35.
- Atehortua, E., & Gartner, C. (2013). Estudios preliminares de la biomasa seca de *Eichhornia crassipes*. *Revista Colombiana de Materiales*, 81-92.
- Ballesteros, M. (2015). Biocarburantes de segunda generación. En G. J. Fernández, M. F. Gutierrez, G. P. Del Río, A. G. San Miguel, R. A. Bahillo, H. J. Sánchez, M. J. Aracil, *Tecnologías para el uso y transformación de biomasa energética* (Vol. 1, pág. 456). Madrid, España: Editorial mundi-Prensa.
- Banco Nacional Do Desenvolvimento . (2008). Bioetanol de caña de azúcar : energía para el desarrollo sostenible (1ra ed., Vol. 1). (Cepal/FAO, Ed.) Rio de Janeiro, Brasil: BNDES.
- Barbanti, D., Mastrocola, D., & Severini, C. (1994). Air drying of plums: a comparison among twelve cultivars. *Sciences des Aliments*, 61-73.
- Becerra, A. L. (2010). La industria del etanol en México. (UNAM, Ed.) *Economía*, 6 , 2-13.
- Butt, D. (2006). hermochemical processing of agroforestry biomass for furans, phenols, cellulose and essential oils. *Rural Industries Research and Development Corporation*, 26.
- Carreón Rodríguez, O. E., Ramos López, A. S., Centeno Lejía, S., Leal Reyes, L. J., & Fernández Sandoval, M. T. (2009). Etanol Carburante. (U. N. Instituto de Biotecnología, Ed.) *Biotecnología*, 13(III), 88-90.
- Carreras Díaz, G. (2010). Universidad Autónoma de México. Obtenido de http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/hja/file/BMat_CBS/Grado_Avance_reaccion09P.pdf

- Casillas, M. (2010). Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería, en: Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal. Tesis. Madrid, España: Universidad Politécnica de Madrid.
- CEDRSSA. (2010). Centro de estudios para el desarrollo rural sustentable y la soberanía alimentaria. Recuperado el July de 2017, de <http://www.cedrssa.gob.mx/>
- CEPAL. (2011). Estudio regional sobre la economía de los biocombustibles 2010. Santiago de Chile.
- Cerdá, E. (2012). Energía obtenida a partir de biomasa. Revistas ICE, 117-140. Obtenido de http://www.revistasice.com/CachePDF/CICE_83_117-140__78E2E154C2BB213409D09C083013930C.pdf
- CGEE. (2006). Biocombustíveis. Nota técnica. Brasília: Centro de Gestão de Estudos Estratégicos, Núcleo de Assuntos Estratégicos da Presidência da Republica.
- Chanta, T. V. (2015). Producción de biocombustible a partir de biomasa lignocelulósica de sorgo dulce (*Sorghum bicolor* Var. Sugar Drip) por extracción de vapor. Tesis de grado, Universidad Nacional de Piura, Facultad de ingeniería industrial, Piuri, Perú.
- Chávez, A. G., Ángeles, P. G., Pérez, S. M., López, L. M., García, M. E., & Wayson, C. (2016). Distribución de la biomasa aérea en un bosque de *Pinus patula* bajo gestión forestal en Zacualtipán, Hidalgo, México. *Madera y Bosques*, 22(3), 24- 25.
- Chávez-Sifontes, M., & Domine, M. E. (25 de 10 de 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.
- CONABIO. (2012). Consejo Nacional para el Conocimiento de la Biodiversidad. Obtenido de Enciclovida: <http://www.enciclovida.mx/especies/6021402.pdf>

- Cooper, B. B. (20 de Mayo de 2013). Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales. *VERTIENTES Revista Especializada En Ciencias de La Salud.*, 1(16), 19-22.
- Cortéz, O. W. (10 de Febrero de 2014). Tratamientos Aplicables a Materiales Lignocelulósicos para la Obtención de Etanol y Productos Químicos. *Revista de tecnología*, 13(1), 39-44. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/301674758_Tratamientos_Aplicables_a_Materiales_Lignocelulosicos_para_la_Obtencion_de_Etanol_y_Productos_Quimicos
- Cortínez, V. V. (2010). Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: Hidrólisis ácida y líquidos iónicos. Tesis, Universidad de Chile, Departamento de ingeniería química y biotecnología, Santiago de Chile. Recuperado el 16 de julio de 2018, de http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2010/cf-cortinez_vv/pdfAmont/cf-cortinez_vv.pdf
- Cuervo, L., Folch, J. L., & Quiroz, E. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología*, 13(3), 11-25.
- Cunningham, R., & López, G. (1994). Etanol de Lignocelulósicos Tecnología y Perspectivas. España: Universidad de Santiago de Compostela .
- D'Água, D. C., Pereira, G. R., & Marinho, F. J. (2015). Preparación y Caracterización Física del Biocombustible Sólido del Lirio Acuático (*Eichhornia crassipes*). *Información Tecnológica*, 53-62.
- De Juana Sardón, J. M. (2003). Energías renovables para el desarrollo (Vol. I). Madrid, España: Paraninfo. Obtenido de <https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=NyvcConR-xoC&oi=fnd&pg=PR3&dq=energ%C3%ADas+renovables+desarrollo&ots=7GwVtJCwpu&sig=h5aYAiiOnW1FHI42rdbAAnbnywQ#v=onepage&q=energ%C3%ADas%20renovables%20desarrollo&f=false>
- Díaz, F. A., & Espinoza, R. M. (2016). Promoción de biomasa y azúcares en sorgo dulce mediante abonos orgánicos y micorriza arbuscular. *Revista internacional de Contaminación ambiental*, 3(32), 354-355.

- DOF. (2015). Ley de transición energética. Secretaría de energía. México, D.F: Diario oficial de la Federación.
- Dofur, J. (2012). Transformación de biomasa lignocelulósica en biocombustibles oxigenados de elevada densidad energética. Recuperado el 29 de octubre de 2018, de www.madrimasd.org: <http://www.madrimasd.org/blogs/energiasalternativas/2012/10/04/131717>
- Du, Y. (2007). Promoting Bio-Ethanol in the United States by Incorporating Lessons from Brazil's National Alcohol Program. *NCSSMST Journal*, 13, 12-17. Recuperado el 10 de January de 2018, de <https://eric.ed.gov/?q=bioethanol&id=EJ855051>
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., & Heinze, T. (2015). Hemicellulose. *Advances in Polymer Science*, 1–67.
- EIA. (2012). Energy Information Administration. Biofuels Issues and Trends. Obtenido de <http://www.eia.gov/biofuels/issuestrends/pdf/bit.pdf>
- Espinoza, A. S. (2015). Obtención de alcohol etílico a partir del almidón de banano (Cavendish gigante) en la provincia del oro, el guabo, 2014. Tesis de grado, Universidad técnica de Macahala, Unidad académica de ciencias químicas y de la salud, Ecuador.
- Espinoza, W., Goddar, M., Gutiérrez, C., Bonfil, C. (2018). Biocombustibles. Recuperado el 07 de 11 de 2018 de [www.comovez.unam](http://www.comovez.unam.mx). <http://www.comoves.unam.mx/numeros/articulo/123/los-biocombustibles>.
- FAO. (2013). Estado del arte y novedades de la bioenergía en Brasil. En M. A.
- FAO. (2018). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Recuperado el 04 de 04 de 2018, de [FAO.ORG: http://www.fao.org/energy/bioenergy/es/](http://www.fao.org/energy/bioenergy/es/)
- Fernández, G. M.-H. (2014). Comparación de la cinética de fermentación de 27 cepas de *S. cerevisiae*. España: Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada (IRICA).
- Ferrer, J., Páez, G., Arenas de Moreno, L., Chandler, C., Mármol, Z., & Sandoval, L. (2002). Cinética de la hidrólisis ácida de bagacillo de caña de. *Revista de Facultad de Agronomía*, 24.

- Food and Agriculture Organization. (2007). Evaluación de la Situación de la Seguridad Alimentaria Mundial. Recuperado el 04 de 2018, de Fao org: <http://www.fao.org/docrep/meeting/009/J4968s/j4968s00.htm>
- Galgano, P. D., Loffredo, C., Sato, B. M., Reichardt, C., & El Seoud, O. A. (2012). Introducing Education for Sustainable Development in the Undergraduate Laboratory: Quantitative Analysis of Bioethanol Fuel and Its Blends with Gasoline by Using Solvatochromic Dyes. *Chemistry Education Research and Practice*, 13, 147-153. doi:10.1039/C1RP90061G
- Geankoplis, C. (1998). Procesos de transporte y operaciones unitarias (3ra edición. ed.). México: Cecsa.
- Gibbons, B. R. (2002). Crystal Structure of the autocatalytic initiator of glycogen synthesis, glycogenin. *Biología Molecular*, 463-477.
- Gómez, A., Ríos, L., & Peña, J. (2012). Madera, un Potencial Material Lignocelulósico para la Producción de Biocombustibles en Colombia. *Información Tecnológica*, 23, 73-86. doi:ISSN 0718-0764
- Gómez, M. A., & Cárdenas, E. A. (2000). Control químico y biológico del lirio acuático *Eichhornia crassipes* (mart.) solms en el río Mololoa. *Revista Agraria*(16), 13 – 34.
- González, A. D., & Kafarov, V. (2009). Producción de biocombustibles de tercera generación: Extracción de aceites de microalgas para la producción de biodiesel. Memorias del IV Simposio de Química Aplicada – SIQUIA 2009, Universidad Industrial de Santander, Centro de Investigaciones para el Desarrollo sostenible en Industria y Energía , Colombia. Recuperado el 17 de Mayo de 2018, de <http://blade1.uniquindio.edu.co/uniquindio/eventos/siquia/siquia2009pon12.pdf>
- González, Á. M. (2009). Producción de bioenergía en el norte de México: Tan lejos y tan cerca... *Frontera Norte*, 21(41), 179-183.
- González, A. M. (5 de julio de 2013). Morfología de Plantas Vasculares. Recuperado el 9 de mayo de 2018, de <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema7/7-3pared2.htm>

- González, M. A., Barrios, C. Y., Born, S. G., & Koleff, O. P. (2010). El sistema de información sobre especies invasoras. En C. N. Biodiversidad., Especies acuáticas invasoras en México (págs. 95-112). México, México.
- Gopalakrishnan, A. M. (2011). Integrated biological control of water hyacinths, *Eichhornia crassipes* by a novel combination of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (valenciennes, 1844), and the weevil, *Neochetina* spp. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 162-166.
- Guevara, G. M., & Ramírez, C. L. (2015). *Eichhornia crassipes*, su invasividad y potencial fitorremediador. *La granja, revista de ciencias de la vida*, 5-11.
- Gunnarsson, C. C., & Mattsson, P. C. (2007). Water hyacinths as a resource in agriculture and energy production: A literature review. (Elsevier, Ed.) *Waste Management*, 27, 117 – 129. doi:<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.12.011>
- Gutiérrez, E. R. (1997). Avances y perspectivas del control de lirio acuático en México Memoria de la reunión regional sobre control integrado de lirio acuático. Informe regional, Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Cuernavaca, México.
- Harun, M. Y., Dayang, A. B., Zainal, Z., & Yunus, R. (2011). Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth. (*Eichhornia crassipes*). *Bioresource Technol*, 102, 5193-5199.
- Harun, N. H., Tuah, P. M., Markom, N. Z., & Yusof, M. (2008). Distribution of heavy metals in *Monochoria hastata* and *Eichhornia crassipes* in natural habitats. *International Conference on Environmental Research and Technology*, 550-553.
- Imai, M. I. (2003). "High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulose species and ultrasonication pretreatment". *Biochem. Eng. J.*, 17, 19-23.
- Juárez, L. G. (2011). Cambios en la composición del lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) debidos a su grado de madurez y a su transformación biotecnológica. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, D.F: IPN.

- Kojima, M., & Johnson, T. (2005). Potential for Biofuels for Transport in Developing Countries. Assistance Programme (ESMAP), International Bank International Bank, Energy Sector Management , Washington D.C.
- Leite, A. R., Vieira, G., Fernandes de Araújo, E., & Olzany, S. D. (2000). FERMENTATION OF SWEET WHEY BY RECOMBINANT ESCHERICHIA COLI KO11. *Brazilian Journal of Microbiology*, 212-215.
- Lestari, S., Mäki-Arvela, P., Beltramini, J., Lu, G., & Murzin, D. (2009). Transforming Triglycerides and Fatty Acids into Biofuels. *ChemSusChem*(2), 1109-1119.
- Lindsey, K., & Hirt, H. (2000). "¡Usos del lirio acuático! Un manual práctico para usos del lirio acuático alrededor del mundo". Anamed International, pp 2 – 4, 5 – 8, 21 – 30 y 31 – 32.
- Lu, F., & John, R. (2010). Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biochemicals and Biofuels. En S. Run-Cang, *Lignin* (First Ed. ed., Vol. 1, pág. 300). Amsterdam, Holanda: Elsevier B.V.
- Machado, C. (2010). Situación de los Biocombustibles de 2da y 3era Generación en América Latina y Caribe. Ministerio de Cooperación Alemana en Bolivia, Bolivia.
- Malik. (2007). Environmental challenge vis a vis opportunity: The case of water hyacinth. *Environment International*. (Elsevier, Ed.) *Environment International*, 122 – 138. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.08.004>
- Malik, A. (2007). Environmental challenge vis a vis opportunity: The case of water hyacinth. *Environment International*(33), 122 – 138.
- Martínez, S. J., Pérez, J. L., & Reinaldo, C. (2015). Producción de biocombustibles en Colombia a partir de fuentes no convencionales. (U. P. Bolivariana, Ed.) Puente. *Revista científica*, 9. doi:<http://dx.doi.org/10.18566/puente.v9n2.a08>
- Martin, C., & Thomsen, B. (25 de January de 2007). Wet oxidation pretreatment of lignocellulosic residues of sugarcane, rice, cassava and peanuts for ethanol production. *Journal Technol-Biotechnol*, 82, 174-181. doi:<https://doi.org/10.1002/jctb.1648>

- Martínez, A. (2008). Estado del arte en la producción de etanol a partir de lignocelulosa. México: Presentación “La Biotecnología Moderna en la Generación de Biocombustibles”.
- Martínez, A. B. (2002). Biotecnología energética sustentable: etanol carburante para el transporte. *Revista Universidad de México*(617), páginas centrales.
- McKendry, P. (2002). Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technology*, 37–46.
- Méndez López, L. P. (2011). Producción de etanol con *escherichia coli* recombinante a partir de xilosa y glucosa obtenidos de hidrolizados del pasto de crecimiento rápido *Paspalum fasciculatum*. Tabasco, México.
- Mesa, G. L., González, S. E., González, C. M., Lopretti, M., & Castro, G. E. (2008). La producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos. Estado del arte. . Cuba.
- Montaño, M. H. (2014). Producción de Bioetanol a Partir de Material Lignocelulósico de Moringa Oleífera. Colombia: Editorial: Universidad Nacional de Colombia.
- Montico, S., Di Leo, N., Bonel, B., Denoia, J., & Costanzo, M. (2012). Biocombustibles: vínculos entre las políticas de gestión territorial y los impactos ambientales y sociales. *Ciencia, docencia y tecnología*, XXIII(44), 197 - 218.
- Morales de la Rosa, S. (2015). Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Química- Física aplicada, Madrid. Recuperado el 2 de Mayo de 2018, de http://digital.csic.es/bitstream/10261/132717/1/morales_de_la_rosa_silvia.pdf
- Morales de la Rosa, S. (2015). Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos. Tesis Doctoral, Madrid, España.

- Morelos, G. J. (21 de 01 de 2016). Análisis de la variación de la eficiencia en la producción de biocombustibles en América Latina. *Estudios Gerenciales*, 32(139), 210-126.
- Muto-Lubota, D. G.-S.-T.-H. (2016). Estrategia colaborativa para asimilar tecnologías energéticas alternativas y co-productos de biomasa forestal. *Ingeniería industrial*, 2, 218-228.
- Narvaes, N., & Martín, M. (2006). *Degradacion Enzimatica de la biomasa de Onopordum nervosum bois*. Madrid: Editorial Universidad Complutense.
- Oliva, C. J. (2010). *Estadística UCV*. Obtenido de Wordpress.com: <https://estadisticaucv.files.wordpress.com/2010/12/asimetria-y-curtosis.pdf>
- Olivas, E. (2012). *Manual de prácticas de microbiología*. Ciudad Juárez Chihuahua. Obtenido de <http://bivir.uacj.mx/Reserva/Documentos/rva2011296.pdf>
- Oyola, G. P. (2017). *Identificación de compuestos inhibidores que se forman en el hidrolizado enzimático de celulosa y hemicelulosa presentes en cáscaras de arroz*. Tesis, Universidad Técnica de Machala, Unidad académica de ciencias químicas y de la salud, Loja, Machala, Ecuador.
- Ramos, C. (2009). *Cambio climático, un desafío a nuestro alcance? (Vol. 10)*. Salamanca, España: Universidad de Salamanca.
- Rinaldi, R., & Schuth, F. (2009). Acid hydrolysis of cellulose as the entry point into biorefinery schemes. *ChemSusChem*(2), 1096-1107.
- Rivas, S. S. (2014). *Valorización de hemicelulosas de origen vegetal*. Tesis doctoral, Universidad de Vigo, Departamento de Ingeniería Química, Vigo, Pontevedra, España.
- Rodríguez, M., Castrillo, M., Velázquez, J. E., Kramer, G., Sedler, C., Zapata, P., & Villava, L. (2017). Obtención de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino pretratado secuencialmente con ácido-base. *Revista internacional Contaminación Ambiental*, 317-324.
- Rojas, P. L. (2011). *Evaluación de pre-tratamientos biológicos y térmicos previos a la hidrólisis enzimática de fibra prensada de palma, para la producción de azúcares fermentables*. Tesis de grado, Universidad Nacional de Colombia,

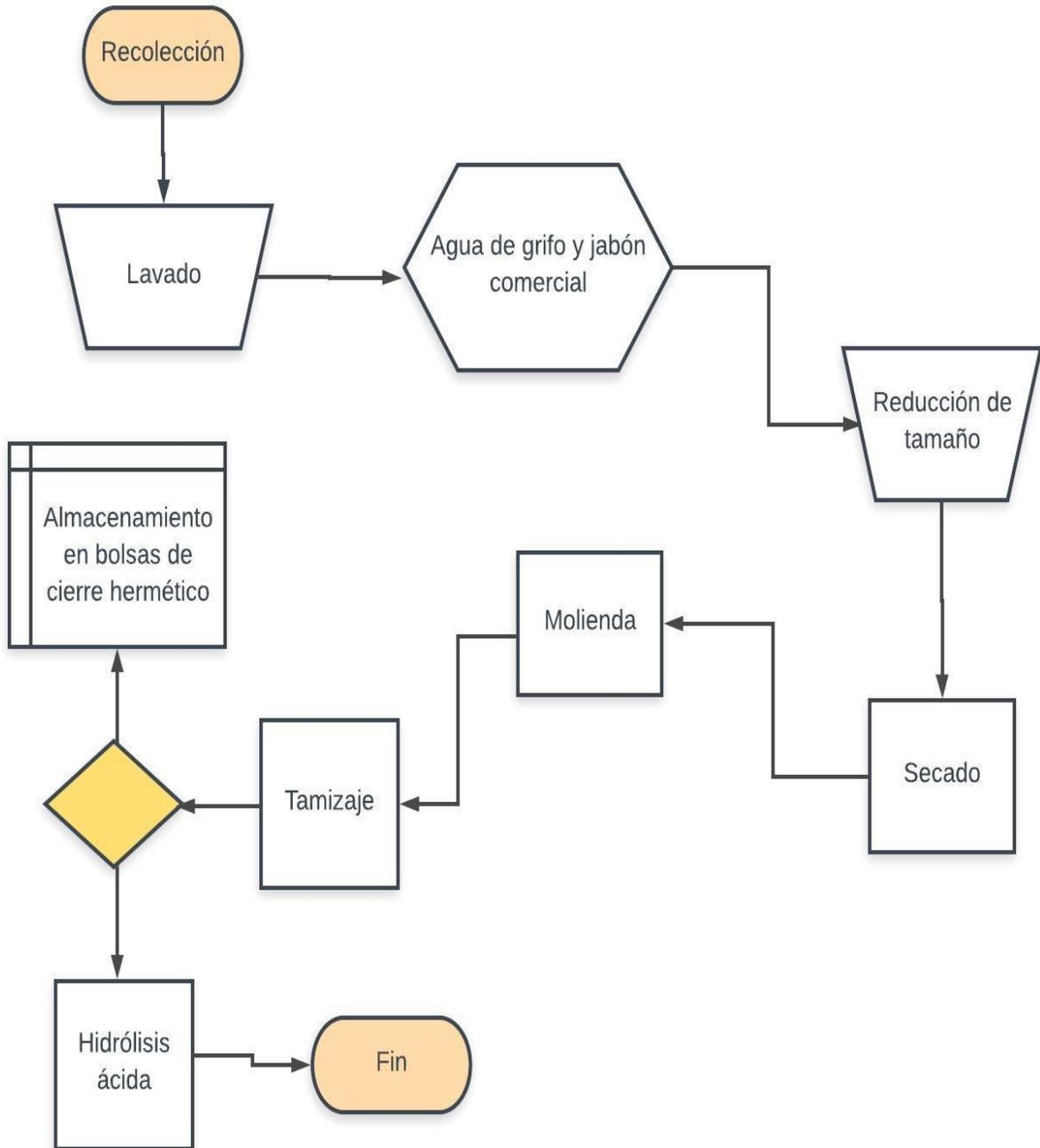
- Departamento de ingeniería Química y Ambiental, Bogotá, Colombia.
Recuperado el 16 de Julio de 2018, de
<http://bdigital.unal.edu.co/3913/1/liliacarolinarojasperez.2011.pdf>
- Ruiz, A. (2014). Obtención de etanol a partir de la fermentación de jarabes hidrolizados de residuos de plátano,. Villahermosa, Tabasco, México.
- SAGARPA. (2009). Los Bioenergéticos en México. . Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Ciudad de México: SEGOB.
- SAGARPA. (S/A). Estrategia Intersecretarial de los Bioenergéticos. CDMX: Secretaría de Gobernación.
- Salinas, C. E., & Gasca, Q. V. (2009). Los biocombustibles. El cotidiano, 1(157), 75-82.
- Sánchez, R. A., Gutiérrez, M. A., Muñoz, H. J., & Rivera, B. C. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. Revista Tumbaga(5), 61-91.
- Secretaría de agricultura. (2016). Catálogo de Ecología, Gobierno Municipal del Marqués, Querétaro, México. Obtenido de El Marqués.gob.mx: http://www.elmarques.gob.mx/inf_consulta/desa_urbano/2015-2018/CATALOGO_ECOLOGIA.pdf
- SEGOB. (2013). Programa especial para el aprovechamiento de energías renovables 2013-2018. Secretaría de gobernación, CDMX.
- SENER. (2017). Reporte de avance de energías limpias, primer semestre 2017. Secretaría de Energía, CDMX.
- Serna, F., Barrera, L., & Montiel, H. (28 de Enero de 2011). Impacto Social y Económico en el Uso de Biocombustibles. Journal of Technology Management & Innovation , 6(1), 102-103.
- Serrano, L., & García, A. (2017). Bionic nanocellulose evolution S.L. Industrial Crops and Products, 39.
- Sheng, G. S. (2011). Hot compressed water pretreatment of oil palm fronds to enhance glucose recovery for production of second generation bio-ethanol.

- (S. direct, Ed.) *Bioresource Technology*, 101(XIX), 7362-7367.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.048>
- Sierra, A., Simonne, E., & Treadwell, D. (2014). Principios y prácticas para el manejo de nutrientes en la producción de Hortalizas. Obtenido de <http://www.innovacion.gob.sv>:
<http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/2917/HS35600.pdf>
- Sousa, F., Martínez, Á. G., De Oliveiro Montero, M. A., Aguilar, C. N., & Azevedo, M. R. (2010). Perspectivas biotecnológicas de hemicelulosas vegetales. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 2(4), 1-4.
- Sun, Y., & Cheng, J. (May de 2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. (Elsevier, Ed.) *Bioresource Technology*, 83(I), 1-11. Recuperado el 16 de July de 2018, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12058826>
- Tapiero, C. J. (2016). Cinética del proceso de fermentación alcohólica en la producción de hidromieles a partir de mieles monoflorales colombianas. Colombia: Universidad del Quindío.
- Tejeda, B. L., Marimón, W., & Medina, M. (2014). Evaluación del potencial de las cáscaras de frutas en la obtención de bioetanol. *Hechos microbiológicos*, 5(I), 4-9.
- Terán, G. J., & Solorzano, S. P. (2013). Obtención de bioetanol del jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) proveniente del embalse Sixto Durán Ballén mediante proceso enzimático. Tesis, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Ingeniería ambiental.
- USDA. (2010). Natural Resources Conservation Service. Obtenido de United States Department of Agriculture: <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=EICR>
- Vélez, F. A. (2014). Caracterización de plantas acuáticas y material vegetal para el desarrollo de un biocombustible sólido. *Revista Colombiana de Materiales*, 152-157. Recuperado el 18 de May de 2017, de <https://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php/materiales/article/view/19445>.

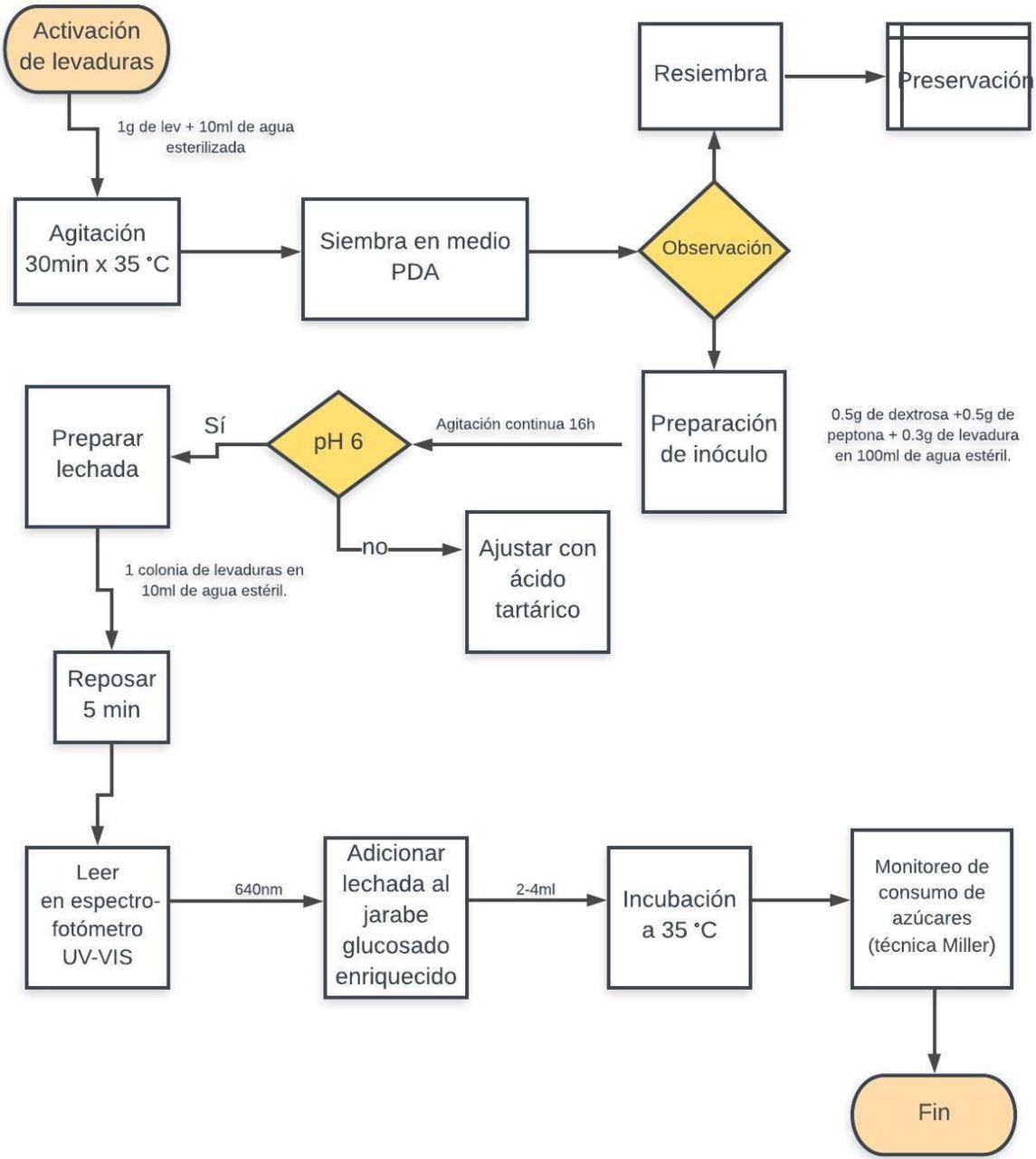
- Viana, L. (2017) La Bioenergía en América Latina y el Caribe. El estado del arte en países seleccionados (Vol. I, págs. 27-29). Santiago, Chile. Recuperado el 28 de mayo de 2018, de <http://www.fao.org/3/a-as112s.pdf>
- Vindell, B. A., & Ochoa, A. T. (2015). Determinación de la concentración de pH en hojas de cultivares clonales *Spondias purpurea* L, en el Arboretum Alain Meyrat de la Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua. Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua, Ciencias Agrarias, Managua, Nicaragua. Obtenido de <http://repositorio.una.edu.ni/3289/1/tnf30v779.pdf>
- Viñals-Verde, M., Bell-García, A., & Michelena-Álvarez, G. R.-M. (2012). Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, 46(1), 7-16.
- Ximénez, C. (2010). UAM. Obtenido de https://www.uam.es/personal_pdi/psicologia/carmenx/EsquemaTema3.pdf
- Yang Ying, S.-S. R. (2009). Dilute acid pre-treatment of oven-dried switchgrass germplasms for bioethanol production. *Energy and Fuels*, 3759–3766.

ANEXO I. Diagramas de proceso

Pre- Tratamiento de material lignocelulósico



Fermentación



Anexo II. Datos experimentales para análisis estadístico

Tratamiento	Abs	Azúcares (mg/ L)	Azúcares (g/l)	Azúcares mg/g muestra
10%	0.988	1,465.48	1.47	32.24
10%	0.664	1,018.29	1.02	24.44
10%	0.908	1,355.06	1.36	25.75
10%	1.009	1,494.46	1.49	26.90
10%	0.985	1,461.33	1.46	26.30
10%	0.905	1,350.92	1.35	25.66
10%	0.683	1,044.51	1.04	22.97
10%	0.626	965.84	0.96	15.45
10%	1.108	1,631.10	1.63	34.25
10%	0.972	1,443.39	1.44	30.31
10%	0.784	1,183.91	1.18	17.75
10%	0.687	1,050.03	1.05	18.90
15%	0.959	1,425.45	1.43	32.79
15%	0.93	1,385.43	1.39	29.09
15%	0.837	1,257.07	1.26	26.40
15%	0.986	1,462.71	1.46	27.79
15%	0.911	1,359.20	1.35	24.46
15%	0.924	1,377.14	1.37	31.67
15%	0.937	1,395.08	1.39	32.08
15%	0.629	969.98	0.96	20.36
15%	0.65	998.97	0.99	21.97
15%	0.551	862.33	0.86	17.24
15%	0.686	1,048.65	1.04	23.07
15%	0.799	1,204.62	1.2	26.50
20%	0.874	1,308.14	1.31	27.47
20%	0.843	1,265.35	1.27	32.90
20%	0.745	1,130.09	1.13	25.99
20%	0.87	1,302.61	1.3	27.35
20%	0.831	1,248.78	1.24	24.97
20%	0.795	1,199.09	1.19	27.57
20%	0.827	1,243.26	1.24	31.08
20%	0.892	1,332.97	1.33	27.99
20%	0.785	1,185.29	1.18	23.70
20%	0.904	1,349.54	1.34	28.34
20%	0.873	1,306.75	1.3	27.44

20%	0.857	1,284.67	1.28	19.27
25%	0.821	1,234.98	1.23	18.52
25%	0.714	1,087.30	1.09	22.83
25%	0.8	1,206.00	1.21	21.71
25%	0.697	1063.839	1.06	18.08
25%	0.575	895.455	0.89	18.80
25%	0.586	910.637	0.91	14.57
25%	0.685	1047.277	1.04	18.85
25%	0.836	1255.687	1.25	18.83
25%	0.748	1134.23	1.13	29.48
25%	0.646	993.449	0.99	24.83
25%	0.74	1123.188	1.12	28.07
25%	0.704	1073.501	1.07	23.61

ANEXO III. Experimentos preliminares

				Conc. mg/L	Conc. g/L	V (ml)	V (L)	Conc. mg/g muestra	
CONCENTRACIÓN DE H ₂ SO ₄	TIEMPO	SERIES	ABS ENSAYO	VALOR DE (Y)	ENSAYO	ENSAYO	ENSAYO	ENSAYO	PROMEDIO
4%	2	A1	0.909	1988.9907	1.9889907	11.5	0.0115	22.87339305	23.69142993
4%	2	A2	0.794	1750.6762	1.7506762	14	0.014	24.5094668	
4%	4	B1	0.782	1725.8086	1.7258086	8.5	0.0085	14.6693731	14.72697665
4%	4	B2	0.498	1137.2754	1.1372754	13	0.013	14.7845802	
6%	2	C1	0.701	1557.9523	1.5579523	16	0.016	24.9272368	22.4062874
6%	2	C2	0.66	1472.988	1.472988	13.5	0.0135	19.885338	
6%	4	D1	1.116	2417.9568	2.4179568	11	0.011	26.5975248	25.57401015
6%	4	D2	0.739	1636.6997	1.6366997	15	0.015	24.5504955	
8%	2	E1	0.597	1342.4331	1.3424331	17.5	0.0175	23.49257925	26.97331298
8%	2	E2	0.649	1450.1927	1.4501927	21	0.021	30.4540467	
8%	4	F1	0.547	1238.8181	1.2388181	20	0.02	24.776362	30.205788
8%	4	F2	0.809	1781.7607	1.7817607	20	0.02	35.635214	

				Conc. mg/L	Conc. g/L	V (ml)	V (L)	Conc. mg/g muestra	
CONCENTRACIÓN DE H ₂ SO ₄	TIEMPO	SERIES	ABS 1	VALOR DE (Y1)	REP.1	REP.1	REP.1	REP.1	PROMEDIO
4%	2	A1	0.914	1999.3522	1.9993522	11	0.011	21.9928742	21.5423576
4%	2	A2	0.967	2109.1841	2.1091841	10	0.01	21.091841	
4%	4	B1	0.978	2131.9794	2.1319794	14	0.014	29.8477116	26.763719
4%	4	B2	0.988	2152.7024	2.1527024	11	0.011	23.6797264	
6%	2	C1	0.945	2063.5935	2.0635935	13	0.013	26.8267155	26.59772635
6%	2	C2	0.928	2028.3644	2.0283644	13	0.013	26.3687372	
6%	4	D1	0.949	2071.8827	2.0718827	13.5	0.0135	27.97041645	27.31774628
6%	4	D2	0.939	2051.1597	2.0511597	13	0.013	26.6650761	
8%	2	E1	0.899	1968.2677	1.9682677	17	0.017	33.4605509	33.77129158
8%	2	E2	0.889	1947.5447	1.9475447	17.5	0.0175	34.08203225	
8%	4	F1	0.774	1709.2302	1.7092302	19	0.019	32.4753738	31.4193354
8%	4	F2	0.926	2024.2198	2.0242198	15	0.015	30.363297	

				Conc. mg/L	Conc. g/L	V (ml)	V (L)	Conc. mg/g muestra	
CONCENTRACIÓN DE H ₂ SO ₄	TIEMPO	SERIES	ABS 3	VALOR DE (Y3)	REP.3	REP.3	REP.3	REP.3	PROMEDIO
4%	2	A1	0.884	1937.1832	1.9371832	8.5	0.0085	16.4660572	16.9592646
4%	2	A2	0.94	2053.232	2.053232	8.5	0.0085	17.452472	
4%	4	B1	0.886	1941.3278	1.9413278	11.5	0.0115	22.3252697	23.3261906
4%	4	B2	0.97	2115.401	2.115401	11.5	0.0115	24.3271115	
6%	2	C1	0.82	1804.556	1.804556	17	0.017	30.677452	24.3544616
6%	2	C2	0.916	2003.4968	2.0034968	9	0.009	18.0314712	
6%	4	D1	0.943	2059.4489	2.0594489	10	0.01	20.594489	21.73818995
6%	4	D2	0.953	2080.1719	2.0801719	11	0.011	22.8818909	
8%	2	E1	0.84	1846.002	1.846002	16	0.016	29.536032	28.15443385

8%	2	E2	0.943	2059.4489	2.0594489	13	0.013	26.7728357	
8%	4	F1	0.901	1972.4123	1.9724123	10.5	0.0105	20.71032915	21.78906208
8%	4	F2	0.832	1829.4236	1.8294236	12.5	0.0125	22.867795	

				Conc. mg/L	Conc. g/L	V (ml)	V (L)	Conc. mg/g muestra	
CONCENTRACIÓN DE H ₂ SO ₄	TIEMPO	SERIES	ABS 4	VALOR DE (Y4)	REP.4	REP.4	REP.4	REP.4	PROMEDIO
4%	2	A1	0.398	930.0454	0.9300454	9.5	0.0095	8.8354313	9.8407019
4%	2	A2	0.425	985.9975	0.9859975	11	0.011	10.8459725	
4%	4	B1	0.382	896.8886	0.8968886	9	0.009	8.0719974	7.40740795
4%	4	B2	0.245	612.9835	0.6129835	11	0.011	6.7428185	
6%	2	C1	0.348	826.4304	0.8264304	12	0.012	9.9171648	9.62932375
6%	2	C2	0.359	849.2257	0.8492257	11	0.011	9.3414827	
6%	4	D1	0.454	1046.0942	1.0460942	12.5	0.0125	13.0761775	13.09524195
6%	4	D2	0.436	1008.7928	1.0087928	13	0.013	13.1143064	
8%	2	E1	0.588	1323.7824	1.3237824	12.5	0.0125	16.54728	15.46388085
8%	2	E2	0.483	1106.1909	1.1061909	13	0.013	14.3804817	
8%	4	F1	0.467	1073.0341	1.0730341	12	0.012	12.8764092	11.8966286
8%	4	F2	0.476	1091.6848	1.0916848	10	0.01	10.916848	