

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

*Trabajo de titulación previo
a la obtención de título
de Ingeniera Ambiental*

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**“OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE BIOMASA
LIGNOCELULOSICA PRESENTE EN LA CASCARILLA DEL
ARROZ PARA SER UTILIZADOS EN EQUIPOS MOTORIZADOS”**

AUTORA:

VÁSQUEZ RUIZ SAMANTHA MAITE

TUTOR:

ING. JORGE BRAULIO AMAYA PINOS, PhD.

Cuenca - Ecuador

2019

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Samantha Maite Vásquez Ruiz con documento de identificación N° 1400739882 manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales, en virtud de que soy autora del trabajo de titulación: **“OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULOSICA PRESENTE EN LA CASCARILLA DEL ARROZ PARA SER UTILIZADOS EN EQUIPOS MOTORIZADOS”**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniera Ambiental* en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad como facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi consideración de autora me reservo los derechos de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el omento que haga la entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, julio del 2019



Samantha Maite Vásquez Ruiz

C.I. 1400739882

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULOSICA PRESENTE EN LA CASCARILLA DEL ARROZ PARA SER UTILIZADOS EN EQUIPOS MOTORIZADOS”**, realizado por Samantha Maite Vásquez Ruiz, obteniendo el *Trabajo Experimental* que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, julio del 2019



Ing. Jorge Braulio Amaya Pinos, PhD.
CI: 0103444923

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Samantha Maite Vásquez Ruiz con documento de identificación N° 1400739882, autora del trabajo de titulación: **“OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULOSICA PRESENTE EN LA CASCARILLA DEL ARROZ PARA SER UTILIZADOS EN EQUIPOS MOTORIZADOS”**, certifico que el total contenido del *Trabajo Experimental* es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, julio del 2019



Samantha Maite Vásquez Ruiz

C.I. 1400739882

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación quiero 0dedicarles a mis padres Cleber Vásquez y Rina Ruiz por el gran esfuerzo moral y económico que hicieron para poder culminar mi carrera, a mi hermana y mi hermosa sobrina por ser un apoyo anémico trascendente en mi lucha y sobre todo a mi hermano por ser mi inspiración y parte del día a día para lograr este tan importante éxito. A mis familiares, amigos y profesores que me han brindado su apoyo durante todo este tiempo.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi tutor por su entera disposición en el desarrollo de mi trabajo de titulación.

A mis padres por estar siempre pendiente de mí en todo el proceso de mi carrera Universitaria, a mis familiares, amigos y compañeros con los que compartí los mejores momentos durante mi formación como profesional.

Y a cada una de las personas que me brindaron su apoyo en todo el proceso de la Carrera, quedando plenamente agradecidos con ellos.

Resumen

En el presente trabajo se muestra los diferentes procesos para poder obtener bioetanol a partir de la celulosa presente en la cascarilla de arroz. La cascarilla de arroz fue suministrada por la “Arrocera Sucúa” ubicada en la provincia de Morona Santiago. El análisis realizado a la materia prima presentó un porcentaje de humedad inicial de 13,99% aproximadamente, un tamaño del grano promedio de 1,40mm y un contenido de cenizas del 20%. En la etapa de pretratamiento se logró extraer la celulosa de la materia prima mediante un tratamiento químico utilizando ácido sulfúrico al 0,4%, hidróxido de sodio al 20% y cloruro de sodio al 0,5%. Se calentó por 1 hora, a 40°C y se lo dejó secar por 24 horas en un horno industrial a 30°C. Se evaluó el proceso de la hidrólisis ácida y enzimática para convertir la celulosa en azúcares reductores utilizando una concentración de ácido sulfúrico al 2% (para las dos hidrólisis), a 125°C a 1 atmósfera de presión por 3 horas. Teniendo una conversión de azúcares del 70% para la hidrólisis ácida y de 85% para la hidrólisis enzimática. La fermentación alcohólica se realizó mediante siete días, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* (levadura), en donde se obtuvo 29 ml de bioetanol aproximadamente. Finalmente, se logró obtener bioetanol a partir de la celulosa que contiene la cascarilla de arroz con características muy importantes para pensar en generar este alcohol en grandes cantidades.

Abstract

In the present work, the different processes to obtain bioethanol from the cellulose present in the rice husk are shown. The rice husk was supplied by the "Arrocera Sucúa" located in the province of Morona Santiago. The analysis performed on the raw material showed an initial moisture content of approximately 13.99%, an average grain size of 1.40 mm and an ash content of 20%. In the pre-treatment stage, cellulose was extracted from the raw material by means of a chemical treatment using 0.4% sulfuric acid, 20% sodium hydroxide and 0.5% sodium chloride. It was heated for 1 hour at 40 ° C and allowed to dry for 24 hours in an industrial oven at 30 ° C. The process of acid and enzymatic hydrolysis was evaluated to convert the cellulose into reducing sugars using a concentration of 2% sulfuric acid (for both hydrolysis), at 125 ° C at 1 pressure atmosphere for 3 hours. Having a conversion of sugars of 70% for acid hydrolysis and 85% for enzymatic hydrolysis. The alcoholic fermentation was carried out for seven days, using *Saccharomyces cerevisiae* (yeast), where 12 grades of alcohol were obtained. Finally, bioethanol was obtained from the cellulose that contains the rice husk with very important characteristics to think about generating this alcohol in large quantities.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	4
4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	6
4.1 OBJETIVO GENERAL	6
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
5. DESARROLLO	6
5.1 MARCO TEÓRICO	6
5.1.1 <i>Cascarilla de arroz</i>	6
5.1.2 <i>Composición del Material Lignocelulósico</i>	8
5.1.2.1 Lignocelulosa	8
5.1.2.1.1 Celulosa	9
5.1.2.1.2 Hemicelulosa	10
5.1.2.1.3 Lignina	10
5.1.3 <i>Combustible</i>	11
5.1.4 <i>Biocombustible</i>	12
5.1.4.1 Biocombustibles de Primera generación	13
5.1.4.2 Biocombustibles de Segunda Generación	14
5.1.4.3 Biocombustibles de Tercera Generación	15
5.1.4.4 Biocombustibles de Cuarta Generación	15
5.1.5 <i>Biocombustibles en el Ecuador</i>	15
5.1.6 <i>Bioetanol</i>	17
5.1.7 <i>Biomasa</i>	17
5.1.8 <i>Conversión del material lignocelulósico a bioetanol</i>	18
5.1.8.1 Hidrólisis Ácida	18
5.1.8.2 Hidrólisis Enzimática	19
5.1.8.3 Fermentación Biológica	20
5.1.8.3.1 Levaduras	22
5.1.8.3.1.1 Nutrición	23
5.1.8.3.1.2 Factores que afectan el crecimiento	23
5.1.8.3.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
5.1.9 <i>La espectrofotometría UV-Visible (UV/VIS)</i>	25
5.1.10 <i>Espectroscopia FTIR</i>	28
5.1.10.1 FTIR por transmisión:	29
5.1.10.2 Reflexión total atenuada ATR-FTIR:	30
5.1.10.3 Reflexión especular:	30
5.1.10.4 Reflectancia difusa:	30
5.1.11 <i>Cromatografía de Gases</i>	31
5.1.11.1 Método de Análisis Cualitativo:	33
5.1.11.2 Método de Análisis por Coincidencia:	33
5.2 METODOLOGÍA	35
5.2.1 <i>Experimental:</i>	35
5.2.1.1 Materia prima e insumos	35
5.2.1.2 Caracterización de Materias Primas y Productos de Reacción:	36
5.2.1.3 Obtención de la celulosa	36

5.2.1.4	Hidrólisis Ácida.....	36
5.2.1.5	Hidrólisis enzimática	36
5.2.1.6	Fermentación Biológica.....	37
5.2.1.7	Cuantificación.....	37
5.2.1.8	Pruebas Físico - Químicas del Bioetanol	37
5.2.2	<i>Documental – Bibliográfica:</i>	37
5.3	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN	37
5.3.1	<i>Materia Prima</i>	<i>38</i>
5.3.1.1	Determinación del contenido de humedad de la materia prima	38
5.3.1.2	Prueba granulométrica de la materia prima.....	38
5.3.1.3	Determinación del porcentaje de cenizas de la materia prima.....	39
5.3.1.4	Determinación de la solubilidad en agua de la cascarilla de arroz.....	39
5.3.1.5	Determinación de la solubilidad en hidróxido de sodio de la cascarilla de arroz	40
5.3.1.6	Determinación de la solubilidad en agua caliente de la cascarilla de arroz.....	40
5.3.2	<i>Etapa de Pretratamiento</i>	<i>41</i>
5.3.2.1	Obtención de la Celulosa presente en la cascarilla de arroz	41
5.3.2.2	<i>Determinación del porcentaje de celulosa de la cascarilla de arroz</i>	<i>42</i>
5.3.2.3	<i>Determinación del porcentaje de lignina de la cascarilla de arroz</i>	<i>43</i>
5.3.3	<i>Primera Fase</i>	<i>43</i>
5.3.3.1	Hidrólisis Ácida.....	44
5.3.4	<i>Segunda Fase.....</i>	<i>45</i>
5.3.4.1	Hidrólisis Enzimática	45
5.3.5	<i>Tercera Fase</i>	<i>46</i>
5.3.5.1	Fermentación Alcohólica	47
5.3.6	<i>Cuarta Fase</i>	<i>48</i>
5.4	ANÁLISIS LOS RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS APLICADAS	49
5.4.1	<i>Materia Prima</i>	<i>49</i>
5.4.1.1	Humedad.....	49
5.4.1.2	Granulometría.....	49
5.4.1.3	Cenizas	50
5.4.1.4	Solubilidad en agua	50
5.4.1.5	Solubilidad en hidróxido de sodio.....	50
5.4.1.6	Solubilidad en agua caliente	51
5.4.2	<i>Pre tratamiento</i>	<i>51</i>
5.4.2.1	Obtención de Celulosa presente en la cascarilla de arroz.....	52
5.4.2.2	Porcentaje de Celulosa presente en la cascarilla de arroz	53
5.4.2.3	Porcentaje de Lignina presente en la cascarilla de arroz	54
5.4.3	<i>Primera Fase</i>	<i>54</i>
5.4.4	<i>Segunda Fase.....</i>	<i>58</i>
5.4.5	<i>Tercera Fase</i>	<i>62</i>
5.5.6	<i>Cuarta Etapa.....</i>	<i>64</i>
5.5.7	<i>Análisis Estadístico</i>	<i>69</i>
6	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	73
7	CONCLUSIONES	75
8	RECOMENDACIONES	76
9	BIBLIOGRAFÍA	77
10	ANEXOS	90

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 5-5.1. CASCARILLA DE ARROZ.....	8
FIGURA 5-5.2. MODELO DE MOLÉCULAS PRIMARIA DE CELULOSA.....	9
FIGURA 5-5.3. ESTRUCTURA DE LA HEMICELULOSA.....	10
FIGURA 5-5.4. ESTRUCTURA GENERAL DE LA LIGNINA.....	11
FIGURA 5-5.5. EFECTO DE LA HIDRÓLISIS ÁCIDA SOBRE LA LIGNOCELULOSA.....	19
FIGURA 5.6 BALANCE DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....	20
FIGURA 5-5.7. RUTA METABÓLICA DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....	21
FIGURA 5-5.8. LEVADURAS.....	22
FIGURA 5.9. MICROGRAFÍA DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE	25
FIGURA 5.10 COMPONENTES ELEMENTALES DE LOS ESPECTROFOTÓMETROS FUENTE: AUTOR.	26
FIGURA 5.11 USOS DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA UV/VIS.....	28
FIGURA 5.12 APLICACIONES DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA FTIR	31
FIGURA 5.13 EQUIPOS PARA CROMATOGRAFÍA DE GASES	32
FIGURA 5.14 USOS DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES DENTRO DE MÚLTIPLES CAMPOS.....	34
FIGURA 5.15 CELULOSA DE LA CASCARILLA DE ARROZ.....	52
FIGURA 5.16 COMPARACIÓN ENTRE CELULOSA ESTÁNDAR (COLOR NEGRO) Y CELULOSA OBTENIDA DE LA CASCARILLA DE ARROZ (COLOR ROJO).....	53
FIGURA 5.17 CURVA DE CALIBRACIÓN. FUENTE: AUTOR	55
FIGURA 5.18 CURVA DE CALIBRACIÓN.....	56
FIGURA 5.19 CURVA DE CALIBRACIÓN.....	59
FIGURA 5.20 CURVA DE CALIBRACIÓN.....	60
FIGURA 5.21 ANÁLISIS DEL ALCOHOL OBTENIDO MEDIANTE UN PROCESO QUÍMICO. FUENTE: AUTOR.....	66
FIGURA 5.22 COMPARACIÓN DEL ALCOHOL OBTENIDO MEDIANTE UN PROCESO QUÍMICO Y UNA MUESTRA DE ALCOHOL ETÍLICO ESTÁNDAR.....	67
FIGURA 5.23 ANÁLISIS DEL ALCOHOL OBTENIDO MEDIANTE UN PROCESO ENZIMÁTICO.....	68
FIGURA 5.24 COMPARACIÓN DEL ALCOHOL OBTENIDO MEDIANTE UN PROCESO ENZIMÁTICO Y UNA MUESTRA DE ALCOHOL ETÍLICO ESTÁNDAR.....	69
FIGURA 5.25 TABLA DE VALORES CRÍTICOS DISTRIBUCIÓN F, NIVEL DE SIGNIFICACIÓN 0.05 FUENTE: HTTP://WWW.MAT.UDA.CL/HSALINAS/CURSOS/2008/PROBABILIDAD/TABLA F05.PDF	71
FIGURA 6.1. VISTA DE VARIABLES.....	75
FIGURA 6.2. VISTA DE DATOS.....	75
FIGURA 10.1. ANEXO 1, PRUEBAS DE FEHLING A Y FEHLING B.....	90
FIGURA 10.2. ANEXO 2, PRUEBAS DE FEHLING A Y FEHLING B.....	90

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA 5-1. ANÁLISIS GRANULOMÉTRICO A 130 GRAMOS DE CASCARILLA DE ARROZ.....	49
TABLA 5-2. RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA.	51
TABLA 5-3. TABLA RESUMEN DE LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CELULOSA, LIGNINA Y HEMICELULOSA QUE CONTIENE LA CASCARILLA DE ARROZ.	54
TABLA 5-4. DATOS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN.	54
TABLA 5-5. CONCENTRACIONES DE LAS MUESTRAS (HIDRÓLISIS ÁCIDA).....	56
TABLA 5-6. DATOS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN	58
TABLA 5-7. CONCENTRACIONES DE LAS MUESTRAS (HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA).....	60
TABLA 5-8. GRADOS BRIX INICIALES ANTES DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....	62
TABLA 5-9. GRADOS BRIX DEL PROCESO ÁCIDO DESPUÉS DE LA FERMENTACIÓN.	63
TABLA 5-10. GRADOS BRIX INICIALES ANTES DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.	63
TABLA 5-11. GRADOS BRIX DEL PROCESO ENZIMÁTICO DESPUÉS DE LA FERMENTACIÓN.	64
TABLA 5-12. CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS DE LAS SEIS MUESTRAS SOMETIDAS AL PROCESO DE ANÁLISIS.....	65
TABLA 5-13. TABLA ANOVA	73

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los esfuerzos combinados de profesionales en diversas áreas, buscan un sustituto eficiente que permita reemplazar el uso de combustibles fósiles. La bioenergía surge como una alternativa para lograr este fin. Además, posee múltiples características, tales como: favorecer a la variación de la energía en los países, reduce la cantidad de emisiones de gases contaminantes, ayuda a la generación de empleos en el área rural y sustituir de la importación de combustibles (Cuervo & Folch-mallo, 2014).

Entre los residuos agroindustriales vegetales más significativos que posee el Ecuador está la cascarilla de arroz. El Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), en uno de sus informes muestra que el residuo del arroz pertenece a un 22% del total de la producción (Tipanluisa, Moreno, & Celi, 2015). Teniendo en cuenta que una pequeña parte de este porcentaje se utiliza como fertilizante, mientras que el resto es quemado, ya que se considera un desperdicio; surge la necesidad de encontrar una aplicación práctica para estos residuos agrícolas.

Algunas de las soluciones existentes para la acumulación de cascarilla de arroz son los tratamientos químicos, microbiológicos y enzimáticos, todos ellos basados en procesos científicos comprobados. En el presente trabajo, con el objetivo de establecer un tratamiento y procesamiento que nos permita obtener bioetanol a partir de la celulosa presente en este residuo, se realizó un proceso utilizando la hidrólisis ácida, la hidrólisis enzimática y la fermentación. Finalmente, al combustible obtenido, se le realizó pruebas físicas y químicas para cuantificar la cantidad de alcohol obtenido y determinar su calidad.

2. ANTECEDENTES

El bioetanol es un combustible muy competitivo en el sector del transporte y tiene una larga historia como combustible alternativo. El uso de bioetanol inicio en Brasil en el año 1925 seguido por Alemania y Francia en el año 1984 y a partir del siglo XX fue ampliamente utilizado en Europa y Estados Unidos, después de la segunda guerra mundial. Pero el uso de este combustible tuvo un declive por los altos costos que significaba su obtención en comparación con generar combustible a partir del petróleo (Mohd Azhar et al., 2017).

Hasta la década de 1970 en donde se dio la crisis del petróleo el etanol se estableció como un combustible alternativo, varios países comenzaron programas para estudiar y desarrollar una producción de combustible más económica a partir de las materias primas disponibles. El bioetanol fue declarado como una fuente de energía renovable prometedora, con mejores características que los combustibles tradicionales a base de petróleo (es decir índice alto de octano y alto calor de vaporización), por lo que las naciones del mundo fueron impulsadas a expandir el uso y producción de bioetanol (Khattab & Watanabe, 2019).

Los biocombustibles, incluidos el biodiesel y el bioetanol, ya desempeñan un papel importante en el suministro actual de energía renovable, y se estima que habrá un crecimiento continuo en el uso de estas fuentes de biomasa, de acuerdo a la demanda de bioetanol puede aumentan en un 108% ente 2015-2050 (Virgínio e Silva, Almeida, da Conceição Alvim-Ferraz, & Dias, 2018).

Hoy en día, el bioetanol se ha convertido en el combustible con mayor producción en el mundo, con una producción de 40.000 millones de litros durante el año 2004. En este contexto, Brasil produjo 15.066 millones de litros, principalmente de

caña de azúcar; mientras que EE.UU. produjo 13.361 millones de litros, procedentes del almidón del maíz (Garc, n.d.). En América Latina la producción de biocombustibles es liderada por Brasil, Argentina y Colombia (Maciel, 2009).

En el 2015, la producción mundial de bioetanol fue de aproximadamente 98.3 m³, lo que corresponde al 74% de todos los biocombustibles producidos. Esto demuestra el potencial y la relevancia de la producción de esta fuente de energía renovable (Virgínio e Silva et al., 2018).

En el Ecuador, se comenzó con la elaboración de biocombustible el 12 de enero del 2010, utilizando la caña de azúcar. De esta planta se extrae etanol mediante la fermentación de los azúcares existentes en la misma. Luego se mezcla con nafta de alto y bajo octano y se produce un biocombustible denominado “ECOPAÍS”. En el caso de ECOPAÍS, la extracción fue de 40 millones de litros de etanol en el año 2014 (Eduardo, 2018).

Por otra parte, la cascarilla de arroz supone un gran potencial para la producción de bioetanol y que debería ser tomada en cuenta en el Ecuador. Según el MAGAP en su estudio realizado en noviembre del 2010, el 35% de la cascarilla de arroz se utiliza en la industria florícola y criaderos de animales y el porcentaje sobrante es agrupada de la siguiente forma: para la quema dentro de piladoras (50%), tirada en los bordes de las carreteras (15%), quemada en terrenos vacíos (15%), botada en cuerpo de agua (5%), se pierde a causa del viento (5%) (Urquiza & Acero, n.d.).

Siguiendo la tendencia mundial en cuanto a la producción de biocombustibles, la cual ha crecido exponencialmente y se muestra como la principal oportunidad de reemplazar los combustibles derivados de los fósiles (Morelos Gómez, 2016), Ecuador

puede comenzar a formar parte de este desarrollo de carácter sustentable, pero sobretodo amigable con el medio ambiente.

3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El dióxido de carbono emitido por los vehículos que utilizan combustibles fósiles es conocido como el principal agente de aumento de los Gases de Efecto Invernadero (Reynoso & Montes, 2016). Es por ello que, la Organización Mundial de la Salud (OMS), lleva muchos años alertando sobre los efectos de la contaminación ambiental en la salud de los seres humanos (Martín Martín & Sánchez Bayle, 2018). En otros estudios realizados por el grupo Iberdrola, en cinco países en el año 2017, muestra los niveles de emisiones de CO₂ debido a diferentes fuentes de generación. El total de emisiones directas de CO₂ (consumo de combustibles, almacenamiento y transporte de gas, distribución de energía eléctrica y coches de flota), en el año 2017 entre España, Reino Unido, Estados Unidos, México y Brasil fue de 26.846.490 toneladas de CO₂ eq. El total de emisiones indirectas de CO₂ (consumo de electricidad en edificios, pérdidas en red y emisiones de consumo de energía eléctrica de sistemas auxiliares), en el año 2017 entre España, Reino Unido, Estados Unidos, México y Brasil fue de 3.415.197 toneladas de CO₂ eq. Finalmente, el total de otras emisiones indirectas (emisiones de viajes de empleados, emisiones asociadas al transporte de combustible y emisiones asociadas al transporte de empleados desde su residencia hasta su lugar de trabajo), en el año 2017 entre España, Reino Unido, Estados Unidos, México y Brasil fue de 20.591.696 toneladas de CO₂ eq (IBERDROLA, 2017).

Además, la demanda y el precio cada vez mayores de los combustibles fósiles, junto con la creciente preocupación por el calentamiento global debido al aumento de emisiones de gases de efecto invernadero, ha centrado la atención en la producción de

biocombustibles de segunda generación, debido a su sostenibilidad y bajo impacto a la salud y el medio ambiente (Kalia & Saini, 2017).

Es por este gran motivo que se busca hoy en día alternativas a los combustibles derivados de los fósiles, que sean limpios y no alteren las características de nuestro entorno. La cascarilla de arroz para producir bioetanol a partir de residuos agroindustriales es una alternativa para disminuir los gases de efecto invernadero emitidos a la atmósfera y a su vez este es un residuo muy abundante en la Costa del Ecuador. Según los datos recopilados, en el 2005 se obtuvieron 231.038 toneladas (Echeverría & López, 2017); en el 2010, 256.429 toneladas (Rodríguez, n.d.) y, en el 2017, 289.718 toneladas (Echeverría & López, 2017). Estas cantidades normalmente son incineradas por los agricultores para disminuir su volumen, generando emisiones que contienen dioxinas y furanos que son contaminantes orgánicos persistentes. Estas emisiones significan un impacto sobre la salud pública ya que la exposición a dichas sustancias podrían tener serias consecuencias, como: problemas de aprendizaje, déficit de atención, problemas de memoria, hiperactividad, disfunción psicomotora (C & Paris, 2008).

La cascarilla del arroz constituye un residuo agrícola con bajo valor útil, lo que supone que su obtención tenga un costo muy bajo (Baxter, Hastings, Law, & Glass, 2008). Dichos residuos podrían ser aprovechados, utilizándolos como materia prima para la producción de bioetanol combustible (Fleeson et al., 2017). Debido a la abundante generación y acumulación de cascarilla de arroz, han sido varias las investigaciones de aprovechamiento en ámbitos como la generación de biocombustibles, para intentar suplir a los combustibles fósiles (Prada & Carroll E., 2010):

En vista de todo lo mencionado anteriormente, surgió la idea de utilizar la cascarilla de arroz como materia prima para la obtención de bioetanol. Además de que esta celulosa proviene del residuo de la siembra del arroz y con esto no se afecta la seguridad alimentaria.

4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Obtener bioetanol a partir de la celulosa presente en la cascarilla de arroz por medio de una hidrólisis ácida y enzimática.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la composición lignocelulósica del material
- Determinar los parámetros óptimos para las hidrólisis ácidas y enzimáticas.
- Realizar la fermentación biológica de la glucosa obtenida en la hidrólisis ácida y la hidrólisis enzimática.
- Cuantificar la cantidad de bioetanol obtenido mediante métodos analíticos instrumentales.
- Determinar la calidad de bioetanol mediante parámetros físico químicos.

5. DESARROLLO

5.1 MARCO TEÓRICO

5.1.1 Cascarilla de arroz

La cascarilla de arroz es un subproducto formado en el proceso de trituración del grano de arroz, como se puede observar en la figura 5.1. La misma que se localiza en la

parte exterior del grano de arroz compuesta por dos glumas denominadas palea y lemma, unida por dos pericarpios, localizada entre la cáscara y el endosperma (Vargas, Alvarado, Vega Baudrit, & Porras, 2013).

Debido a las características fisicoquímicas de la cascarilla de arroz (celulosa, lignina hemicelulosa, y humedad) resulta lenta su biodegradación lo que le atribuye a ser un desecho altamente contaminante en especial para las fuentes de agua (AGUILAR, 2009).

Usos de la cascarilla de arroz, según (AGUILAR, 2009):

- Uso como combustible en varios países de América Latina
- Uso como generador de gas en Cuba, que puede quemarse en calderas o secadores para la producción de energía térmica.
- Uso en Perú como sustrato en proyectos hidropónicos en hortalizas.
- Uso de camas para crías de aves en Ecuador.
- Fabricación de briquetas (“ladrillos”) en México, para la construcción de paredes, por ejemplo, de cines en donde se necesita que el ruido no salga del lugar.
- Usos en China como compost y abono para regeneración de tierras de cultivos.



Figura 5.1 Cascarilla de arroz.

Fuente: Autor

5.1.2 Composición del Material Lignocelulósico

La composición del material lignocelulósico comprende la celulosa, hemicelulosa y lignina. La lignocelulosa se encuentra presente como un bloque en el interior de la estructura de la pared celular de la planta (VILLALOBOS, 2010). A continuación, se analizarán los conceptos de estos tres componentes del material lignocelulósico por separado.

5.1.2.1 Lignocelulosa

La lignocelulosa es el componente principal de la biomasa y cerca de la mitad de la materia producida por la fotosíntesis, se compone de tres tipos de polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, que están químicamente unidas mediante fuerzas covalentes (Rodríguez et al., 2017).

5.1.2.1.1 Celulosa

La celulosa es el polímero más abundante de la naturaleza, y es considerado el principal componente de varias fibras naturales y el elemento más importante en la estructura de la planta garantizando la rigidez de la estructura celular. Este polímero puede ser sintetizado por algunas bacterias, protozoos y hongos filamentosos (Montaño Morales Fabio Héctor, 2014), (Kouadri & Satha, 2018).

Una planta con una cadena larga de monómeros de glucosa $\beta - 1,4$, contiene celulosa como un componente lineal estructural en su pared celular, como se puede observar en la figura 5.2. Dichos monómeros están unidos con enlaces glucosídicos estos extensos enlaces de hidrogeno llevan a una estructura de matriz cristalina y fuerte (Limayem & Ricke, 2012).

Se estima que la producción anual de celulosa es de casi 200 mil millones de toneladas en todo el mundo. Los materiales derivados de la celulosa muestran propiedades intrínsecas excelentes y deseables, son biocompatibles, biodegradables, tienen una alta resistencia mecánica, tienen una baja densidad y el área de superficie específica es relativamente grande (Song, Ji, Wang, Wei, & Yu, 2018).

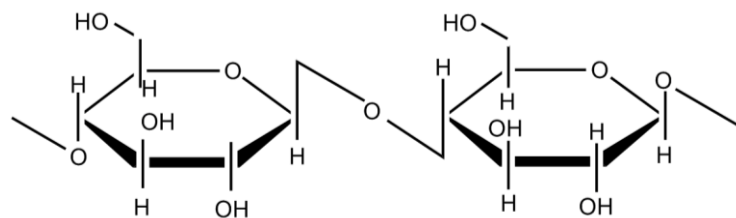


Figura 5.2 Modelo de moléculas primaria de celulosa.

Fuente: Autor

5.1.2.1.2 Hemicelulosa

Las hemicelulosas son los segundos biopolímeros más abundantes en las plantas después de la celulosa, y se lo puede emplear en varias aplicaciones entre ellas como una capa de barrera en el embalaje de papel y cartón (Thuvander & Jönsson, 2019).

Está compuesta por polímeros de diferentes azúcares con cadenas más cortas y ramificadas, como se puede observar en la figura 5.3, lo que la convierte en una estructura más amorfa y más fácil de hidrolizar en azúcares que la celulosa, su papel es suministrar la unión entre la lignina y la celulosa para dar rigidez a la pared celular y son insolubles en agua (Rosa, 2015).

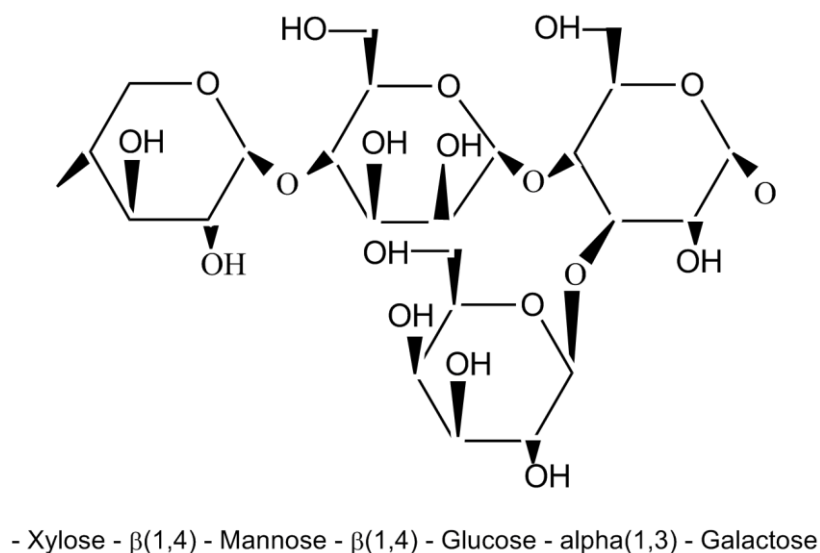


Figura 5.3 Estructura de la hemicelulosa.

Fuente: Autor

5.1.2.1.3 Lignina

La lignina es un polímero tridimensional complejo, como se puede observar en la figura 5.4, cuyas subunidades aromáticas son sintetizadas a través de la ruta de los fenilpropanoides, es además un componente fundamental que proporciona rigidez a los

tejidos vegetales y se deposita de manera abundante en células concretas de las plantas (Zavaleta-Mejía & Lagunes-Fortíz, 2015).

La definición estructural de la lignina no es muy clara (como se observa en la figura 5.4) en comparación con otros polímeros naturales tales como la celulosa y proteínas debido a la complejidad de su estructura que dificulta su aislamiento. Es resistente a la hidrólisis y fácilmente condensable con fenoles o tioles (Chávez-Sifontes & Domine, 2013).

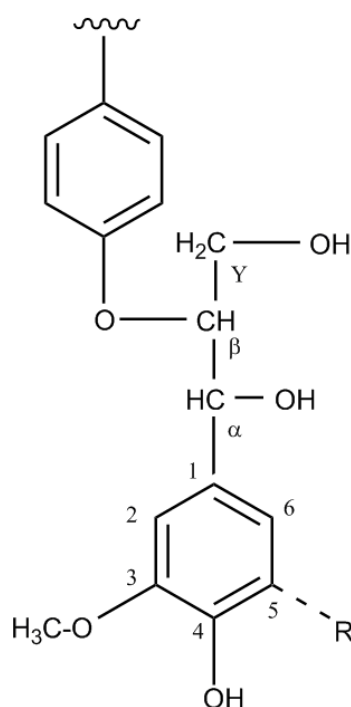


Figura 5.4 Estructura general de la lignina.

Fuente: Autor

5.1.3 Combustible

Los combustibles fósiles, que incluyen carbón, gas natural, petróleo, petróleo de esquisto bituminoso y betún, contienen además de los principales constituyentes (carbono, hidrógeno, oxígeno), otros materiales que incluyen metales, azufre y compuestos de nitrógeno y que durante el proceso de combustión emiten varios

contaminantes como cenizas volantes, óxidos de azufre (SO_2 y SO_3), óxidos de nitrógeno ($\text{NO}_x = \text{NO}_2 + \text{NO}$) y compuestos orgánicos volátiles (Chmielewski, 2014).

5.1.4 Biocombustible

Los biocombustibles son productos químicos enriquecidos con energía producidos a partir de la biomasa que se encuentra en abundancia en la naturaleza, como resultado de la fotosíntesis que convierte el dióxido de carbono atmosférico en azúcar, mediante el uso de energía solar y agua (Darda, Papalas, & Zabaniotou, 2018).

Según (Alejos & Calvo, 2015) a los biocombustibles se les atribuye los siguientes beneficios:

- Su carácter renovable, ya que se puede disponer de ellos en los volúmenes deseados y de esta manera disminuir la dependencia por combustibles fósiles.
- Su neutralidad en CO_2 debido a que las emisiones de CO_2 en su ciclo productivo pueden ser neutralizadas por el CO_2 absorbido durante el crecimiento de los cultivos energéticos mediante fotosíntesis.
- La reducción de emisiones en su proceso de combustión y de material particulado y dióxido de azufre, entre otros, que afectan la salud humana y del medio ambiente.

Sin embargo, las preocupaciones sobre el impacto de los biocombustibles en la seguridad alimentaria han llevado a una nueva clasificación basada en categorías de generación: biocombustibles de primera, segunda, tercera y cuarta generación (Saville & Mason, 2008).

5.1.4.1 Biocombustibles de Primera generación

Se denomina combustible de primera generación cuando su obtención se la realiza a partir de carbohidratos de origen vegetal como la sacarosa o de polímeros simples como el almidón (Zamora-hernández, Prado-fuentes, Capataz-tafur, & Peña-castro, 2014).

Hoy en día la mayoría de los biocombustibles de primera generación provienen de cultivos como moléculas de azúcares, aceites y almidón (Aro, 2016). Como por ejemplo de cultivos energéticos o feedstock de maíz, sorgo, yuca y caña de azúcar, oleaginosas de la soya, aceite de palma, colza, jatropha curca entre otros (Morelos Gómez, 2016).

El proceso que se utiliza para obtener bioetanol a partir de esta materia prima es la fermentación (para azúcares y carbohidratos), transesterificación (para los aceites y grasas), y la digestión anaerobia (para los desperdicios orgánicos). La ventaja de estos biocombustibles es su versatilidad de procesamiento y sus reducidas emisiones de gases de efecto invernadero (Maciel, 2009).

Por otra parte, existen serias preocupaciones sobre la competencia de tierras por alimentos y producción de combustibles, particularmente debido al hecho de que la tecnología actual para la producción de biocombustibles depende de la materia prima derivada de la fracción comestible de las plantas alimenticias anteriormente mencionadas (Aro, 2016).

En este momento la Comisión Europea, ha restringido la utilización de estos combustibles al 7% para el 2010 y el 3,8% para el 2030. Esto debido a la baja reserva de los cultivos utilizados para generar este combustible ya que en determinadas zonas se

deforesta para transformar dichas áreas en cultivos aptos para transformar su almidón en combustible (Abascal Fernández & Garea Vázquez, 2017).

5.1.4.2 Biocombustibles de Segunda Generación

Se lo designa biocombustibles de segunda generación cuando la obtención de etanol se origina a partir de polímeros de carbohidrato complejos como la hemicelulosa o celulosa (Zamora-hernández et al., 2014).

Los biocombustibles de segunda generación son elaborados a partir de residuos o material celulósico, se presenta como una tendencia, ya que tienen una ventaja considerable en términos de emisiones de gases de efecto invernadero, costos y aceptabilidad social en comparación con los biocombustibles de primera generación (Mitkidis, Magoutas, & Kitsios, 2017).

Aquí la producción de bioetanol se da a partir de la lignocelulosa en un proceso que abarca múltiples etapas: La biomasa procesada es pretratada utilizando una combinación de tratamientos térmicos y químicos, alterando las fibras presentes en la celulosa para iniciar la etapa de hidrólisis de la celulosa, el azúcar producido por la hidrólisis es fermentado por levaduras (Hirani, Javed, & Asif, n.d.).

El material más abundante disponible para la producción de bioetanol de segunda generación son los residuos agrícolas como paja, cascarilla de café, cascarilla de arroz, resto de maíz, residuos forestales de corta rotación e industriales y residuos municipales (Kalia & Saini, 2017).

5.1.4.3 Biocombustibles de Tercera Generación

La creación de la tercera generación comenzó con el uso de microalgas, que son superiores en términos de contenido de energía como materias primas para la producción de biocombustibles. En comparación con la primera y segunda generación, la producción de microalgas tiene un costo energético más bajo y no requiere tierras agrícolas y su índice de eficiencia es alto por sus altas tasas de crecimiento (todo el año), por lo tanto, tienen mucho potencial para reemplazar las materias primas de energía fósil en el futuro (Piligaev et al., 2013).

5.1.4.4 Biocombustibles de Cuarta Generación

Los biocombustibles de cuarta generación se basarán en materias primas que son inagotables, baratas y ampliamente disponibles. Comprenden el diseño y estructuración de nuevas partes, dispositivos y sistemas biológicos de las algas y cianobacterias. La producción de biocombustible será a base de carbono reducido y diseño de rutas metabólicas para la producción de combustibles (Aro, 2016).

En esta investigación se obtendrá combustible de segunda generación; debido a que se trabajara con el residuo de la producción del arroz de tipo basmati, derivado de la biomasa lignocelulósica, la cual no tiene repercusiones en la seguridad alimentaria al utilizarse solo el residuo.

5.1.5 Biocombustibles en el Ecuador

En el Ecuador la iniciativa se tomó desde el 12 de enero del 2010, utilizando la caña de azúcar para la extracción del etanol mediante la fermentación de azúcares, mezclando esta sustancia con nafta de alto y bajo octanaje, dicho producto final se lo llamo “ECOPAIS”, este tuvo una producción continua debido no solo al aporte

ambiental, sino también a la colaboración con los mercados productores en las haciendas en el Ecuador (Eduardo, 2018).

A nivel del Ecuador, el consumo en los últimos 8 años en un periodo desde el 2010 al 2018 se ha podido observar que hasta el 2014 no hubo un interés considerable en este producto, pero a partir del 2015 tiene un incremento considerable siendo el 2017 el pico de mayor consumo con casi 10000000 lts (Eduardo, 2018). Desde el 2015 el consumo de biocombustibles estuvo a un nivel del 45 %, frente al 43% del diésel y 12% de la súper, la popularidad creció aún más en las zonas de altura del país pues los motores de vehículos aumentaron hasta en un 7.8 % su potencia debido a la combinación del combustible con el oxígeno de la zona (Madrid, 2015).

En la iniciativa nacional del uso de biocombustibles, una de las principales fuentes de biomasa para producción de etanol, fue el aceite de palma que en el 2008 tuvo una crisis mundial, por ello en el 2009 se sembró un total de 54.5 mil hectáreas principalmente en esmeraldas. Ello derivó de un pasivo ambiental considerable pues se tuvo que intervenir en ciertas áreas para obtener mayor productividad (Castro, 2012).

Dentro de ese enfoque nace a nivel nacional de incitativa de producir nuevos elementos que no impliquen un problema ambiental considerable, ellos son los biocombustibles de segunda generación, por ejemplo los que provienen de materia lignocelulosica que incluso proviene de material residual (Castro, 2012).

A nivel del Ecuador la producción de biocombustible para el 2011 alcanzó los 80000 galones diarios de ecopais. En el país otro de los productos orgánicos que pueden sustituir a los biocombustibles que provienen, por ejemplo de la palma, es el piñón debido a que su impacto ambiental de producción es bajo (Castro, 2012).

5.1.6 Bioetanol

El etanol es un compuesto químico incoloro e inflamable es un líquido incoloro e inflamable esto considerando condiciones normales de temperatura y presión y tiene un punto de ebullición de 78,4°C (Abascal Fernández & Garea Vázquez, 2017).

Puede producirse a partir de diferentes recursos, entre ellos los que contienen sacarosa, almidón y celulosa (Area & Vallejos, 2012). Y se lo puede emplear de forma directa en los motores de combustión interna con algunas transformaciones (Fernández, Lucas, Para, & Transporte, n.d.).

Debido a las buenas características que posee el bioetanol contribuye la combustión más limpia y el mejor desempeño de los motores, lo que favorece a la disminución las emisiones contaminantes (Tierny, Vandeborre, & Daoudi, 2008).

5.1.7 Biomasa

La biomasa vegetal es una mezcla compleja de materiales orgánicos, principalmente carbohidratos (aproximadamente 75% peso seco) y lignina (aproximadamente 25% peso seco) estas proporciones que varían según el tipo de planta, los carbohidratos consisten básicamente en fibras de celulosa o hemicelulosa que dan fuerzas a las estructuras de las plantas, la lignina es el pegamento que mantiene unida las fibras, por lo tanto, los tallos, las ramas y las hojas de las plantas son los componentes lignocelulósico de las plantas. Los recursos de la biomasa incluyen todos los materiales vegetales que están disponibles de forma renovable y periódica (Boundy, Diegel, Wright, & Davis, 2011).

Para reducir la dependencia de los combustibles fósiles y aliviar los problemas ambientales causados por su consumo, se ha puesto énfasis a la sustitución de la energía

no renovable por los recursos de biomasa como fuentes alternativas de energía. Además, los productos químicos basados en biomasa son respetuosos con el medio ambiente, ya que el CO₂ producido mediante el uso de carbohidratos puede alcanzar un equilibrio de carbono en la naturaleza; además como el recurso renovable más grande del mundo. La celulosa no comestible es la alternativa más prometedora a los combustibles a través del bio-refinamiento (Qu et al., 2018).

5.1.8 Conversión del material lignocelulósico a bioetanol

La conversión de la biomasa lignocelulósica a bioetanol se realiza en varias fases: la primera es la fase de pretratamiento que tiene como fin solubilizar la lignina y la hemicelulosa y reducir la cristalinidad de la celulosa. La segunda fase es la obtención de glucosa y se lo realizó por medio de dos procesos, un proceso ácido llamada en esta investigación hidrólisis ácida y un proceso enzimático llamada hidrólisis enzimática, en donde se hidroliza la celulosa pudiendo recuperar azúcares fermentables; la tercera etapa es la fermentación de los azúcares mediante levaduras y la última es la obtención del bioetanol producido.

5.1.8.1 Hidrólisis Ácida

La hidrólisis ácida es un proceso químico en donde los ácidos convierten la hemicelulosa y celulosa (cadenas de polisacáridos que integran la biomasa) en sus monómeros elementales, como se puede observar en la figura 5.5. La hidrólisis ácida de los materiales lignocelulósico es un proceso conocido desde 1819, periodo en los que la escasez de petróleo hizo que se empleara masivamente cuando se generó las dos Guerras Mundiales. Puede realizarse empleando diferentes clases de ácidos como el ácido sulfúrico, clorhídrico, entre otros (Diego, 2014).

La mayoría de la celulosa necesita condiciones de reacción severas, es decir altas temperaturas (320 °C) y altas concentraciones de ácido para liberar la glucosa de estas cadenas estrechamente asociadas, así como una presión de 25 MPa para pasar de una estructura cristalina rígida a una estructura amorfa en agua (Wyman et al., 2004) (Limayem & Ricke, 2012).

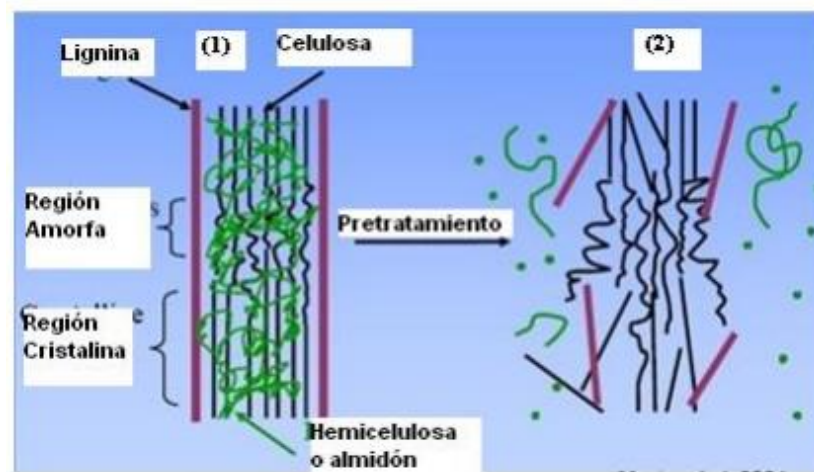


Figura 5.5 Efecto de la hidrólisis ácida sobre la lignocelulosa.

Fuente: (VILLALOBOS, 2010)

5.1.8.2 Hidrólisis Enzimática

La hidrólisis enzimática de la celulosa consta de varios procesos en los cuales la celulosa insoluble se fracciona en la interface sólido-liquido gracias al trabajo sinérgico de la β -1,4 endoglucanasa, β -1,4 exo celobiohidrolasas, β -1,4 glucan hidrolasas y las β -1,4 glucosidasas (Salcedo Mendoza, Galán López, & Pardo Flórez, 2012).

Se lleva a cabo enzimáticamente mediante celulasas, las cuales producen la ruptura de las cadenas poliméricas de la celulosa que preliminarmente ha sido modificada su estructura en el pretratamiento (Houbroun, 2015).

La hidrólisis enzimática es un proceso controlado, bajo factores de pH, temperatura, tiempo de desarrollo y el tipo de enzima usada (Gaviria Acosta, Benítez Benítez, Ienis, & Hoyos Concha, 2015).

5.1.8.3 Fermentación Biológica

El significado más común de la fermentación es la transformación de un azúcar en alcohol, ocurre de forma natural con varios alimentos y los humanos lo han usado intencionalmente desde la antigüedad para perfeccionar tanto la conservación como las propiedades organolépticas de los alimentos. Sin embargo, el término “fermentación” también se emplea en un sentido más extenso como el uso intencional de microorganismos tales como bacterias, levaduras y hongos para elaborar productos rentables a escala industrial (Leona Paulová, 2013).

La fermentación por lo tanto es un proceso en ausencia de total o parcial de oxígeno donde carbohidratos o compuestos relacionados son oxidados para producir energía (Vega, n.d.).

El balance global de la fermentación alcohólica es el siguiente:

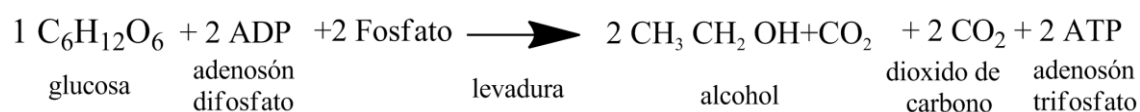


Figura 5.6 Balance de la fermentación alcohólica.

Fuente: Autor

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0,511 gramos de etanol y 0,489 gramos de CO₂ por 1 gramo de glucosa, en la

realidad se dificulta lograr este rendimiento ya que la levadura utiliza la glucosa para la producción de otros metabolitos (Houbron, 2015).

La fermentación alcohólica de D-glucosa se realiza mediante la vía de Embden-Meyerhoff-Pmas (EMP), en esta vía, D-glucosa se fosforila a D-glucosa -6-fosfato y después es isomerizada a D-fructuosa-6-fosfato, por medio de las enzimas hexoquinasa y fosfohexoisomerasa, respectivamente, para acabar la degradación en piruvato, este piruvato se convierte en acetaldehído por acción de la enzima piruvatodescarboxilasa con liberación de CO₂, posteriormente el acetaldehído se convierte en etanol por la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa, como se puede observar en la figura 5.7 (Houbron, 2015).

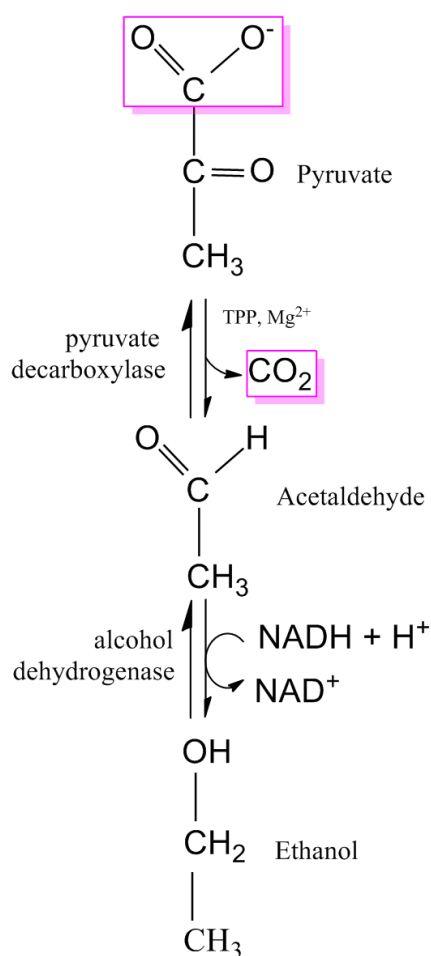


Figura 5.7 Ruta metabólica de la fermentación alcohólica.

5.1.8.3.1 Levaduras

La fermentación es el proceso de utilización de microorganismos que se multiplican creando colonias predominantes llamadas colectivamente “levaduras” para producir productos valiosos, como antibióticos, enzimas industriales, alimentos y productos químicos. Estas levaduras son Eucariotas unicelulares que, en algún momento de su ciclo vital, se dividen por brotes (Saranraj, Sivasakthivelan, & Suganthi, 2017).

Las levaduras poseen varias cualidades de fermentación, por lo que se han utilizado desde la antigüedad para la producción de diferentes clases de alimentos tales como cerveza, pan, vinos y derivados lácteos fermentados, entre las especies de levaduras más conocidas y utilizadas se encuentran *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* y dos del género *Kluyveromyces*: *K. lactis* y *K. marxianus*, como se puede observar en la figura 5.8 (I, Juan, Vidal, & M, 2017).

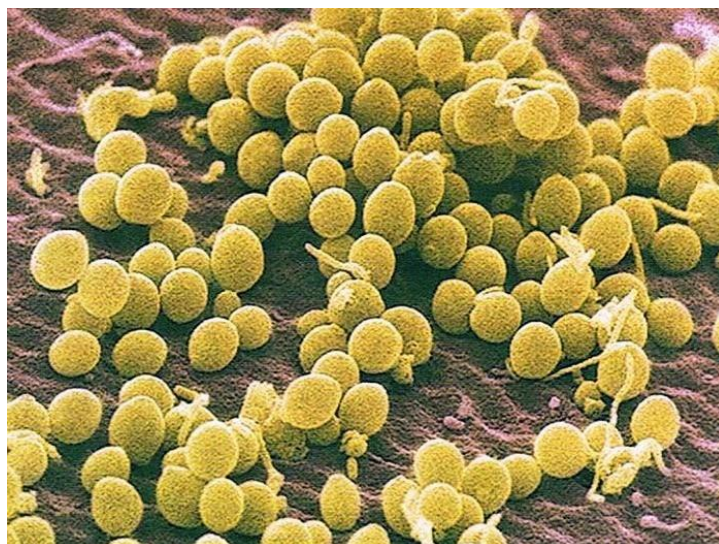


Figura 5.8 Levaduras.

Fuente: (Ricardo Suarez, 2017)

5.1.8.3.1.1 Nutrición

Según (Alvarado, 2012), las levaduras necesitan recibir energía para conservar y reparar su estructura, para sintetizar nuevos componentes celulares como ácidos nucleicos, polisacáridos y enzimas, para poder transformar determinadas sustancias a las células desde sus alrededores, para crecer, multiplicarse y para poder moverse. Es decir, las levaduras necesitan de energía para poder sobrevivir. Los nutrientes más significativos para las levaduras son los carbohidratos que le sirve como fuente de energía (Türker, 2015).

5.1.8.3.1.2 Factores que afectan el crecimiento

Adicionalmente a la nutrición, existen otros factores que también condicionan el crecimiento de las levaduras tales como la temperatura, pH, presión osmótica y el oxígeno.

5.1.8.3.1.2.1 Temperatura

La temperatura que las levaduras necesitan para crecer y desarrollarse está comprendida entre 5 y 37 grados centígrados. El valor óptimo se sitúa hasta los 28 grados centígrados. Sin embargo, la termodestrucción comienza desde los 52°C (Gutiérrez, 2007).

5.1.8.3.1.2.2 pH

Durante su etapa de crecimiento las levaduras metabolizan los componentes del medio como los azúcares, desaminan y decarboxilan los aminoácidos, proteínas y otros componentes de los caldos de crecimiento y alteran considerablemente el pH del medio a la alcalinidad, pudiéndose producir efectos violentos de los metabolitos generados en el medio sobre el producto (Chávez, 2000). En otras investigaciones se demostró una

tolerancia moderada al bajo pH (inferior a 3.5) (Saranraj et al., 2017). Es decir, las levaduras se ven poco afectadas e un pH con rango de 4 a 6.

5.1.8.3.1.2.3 *Presión Osmótica*

Para evitar la plasmólisis la nutrición de la levadura debe ser un proceso estrictamente osmótico, por lo que es importante evitar medios hipertónicos o hipotónicos. El estrés osmótico puede originar una reducción en el volumen celular afectando la velocidad de fermentación (Suárez-machín, Garrido-carralero, & Guevara-rodríguez, 2016).

5.1.8.3.1.2.4 *Oxígeno*

Las levaduras necesitan una cantidad entre 5 y 10 mg/l de oxígeno, ya que actúa en la síntesis de esteroides y ácidos grasos insaturados de la membrana citoplasmática de la levadura; cuyos componentes son responsables de la resistencia de las levaduras al alcohol al final de la fermentación. (Javier, Agenjo, & L, 2014).

5.1.8.3.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Los materiales lignocelulósicos contienen azúcares que pueden liberarse por hidrólisis, y posteriormente fermentar a etanol mediante el proceso de las levaduras como por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* (Palmqvist, 2000).

Saccharomyces cerevisiae es una levadura *Ascomycete*, se reproduce por gemación, son responsables de la mayoría de las producciones industriales por fermentación, sintetizan la glucosa a través de la ruta de glicolisis generando altas concentraciones de etanol y dióxido de carbono (Alvarado, 2012).

S. cerevisiae como se puede observar en la figura 5.9, es muy abundante en la naturaleza y se puede encontrar en plantas, frutas y en el suelo, no se limita a un hábitat en partícula, sino que es móvil, es capaz de crecer en ambientes con variaciones constantes de carbono y nitrógeno (Farid, Sideeq, Khan, & Niaz, 2019).



Figura 5.9 Micrografía de *Saccharomyces cerevisiae*

Fuente: (De Martin, 2005)

5.1.9 La espectrofotometría UV-Visible (UV/VIS)

Se establece como una técnica de tipo analítico para fijar las concentraciones de un compuesto en una solución. Se basa en una actividad molecular de absorción de radiaciones electromagnéticas y a su vez en la cantidad de luz que se absorbe en función de la forma lineal de concentración (Giovannetti, 2012).

Esta técnica conduce la radiación electromagnética de la luz, proveniente de las regiones visibles, ultravioleta cercana e infrarroja cercana dentro de lo que compone el espectro electromagnético. La energía que se absorbe en forma de radiación se cuantifica gracias a las transiciones electrónicas producidas (Dehghani, Abadi, Ashraf, Chamsaz, & Shemirani, 2012).

La espectrometría de tipo UV/VIS se enmarca dentro de la espectroscopia molecular donde se manejan técnicas como la espectroscopia UV/VIS y la de espectroscopia de fluorescencia UV/VIS (Biswas, Sahoo, & Chatli, 2011).

El equipo empleado en esta técnica es el espectrofotómetro, mismo que permite manipular la longitud de onda de luz que cruza por una solución y mide la cantidad de luz absorbida por la sustancia, tanto longitud como eficiencia de absorción dependen de la estructura atómica de la sustancia y de las características del medio como pH, temperatura, fuerza iónica etc (Arenas & López, 2004).

Todos los equipos de espectrofotómetros constan esencialmente de las siguientes partes.

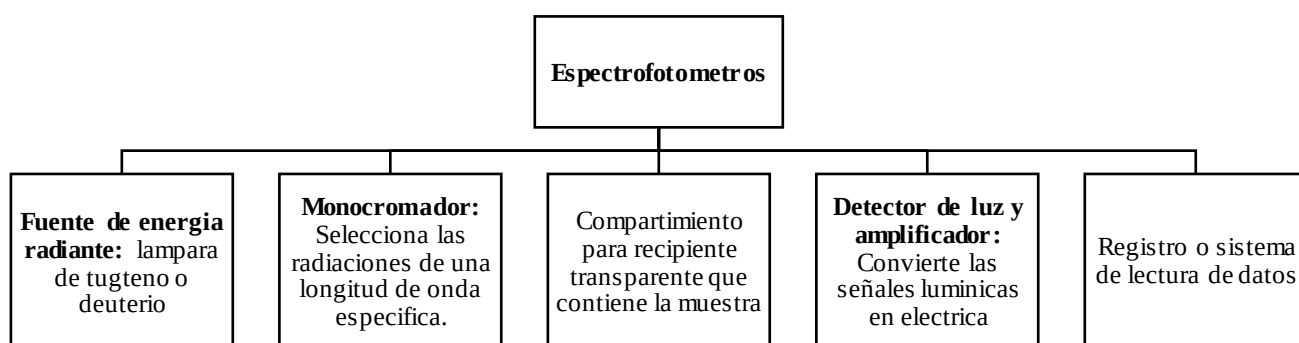


Figura 5.10 Componentes elementales de los espectrofotómetros Fuente: Autor

Para el alcance de trabajo se plantea los de tipo UV-Visible siendo el apartado UV el rango de longitud de onda (200 – 700 nm). Esta región presenta un alto nivel de energía compuestos con dobles enlaces aislados, enlaces peptídicos, triples enlaces, carbonilos, aromáticos y entre otros heteroátomos se absorben en este rango especificado principalmente para compuestos orgánicos (Behera, Ghanty, Ahmad, Santra, & Banerjee, 2012).

Posteriormente, la región visible es donde se puede observar el color de una solución y contiene las longitudes de luz que se transmiten, no que se absorben, sin embargo, en la medición son complementarios. Por ello en la medición se usa la longitud de onda donde se absorbe la luz coloreada (Díaz et al., n.d.).

Entre los métodos más cotidianos para análisis de la concentración por espectrofotometría UV/VIS, se allá la curva de calibración misma que emplea una gráfica que relaciona la concentración de por lo menos 5 soluciones conocidas, en razón a la absorbancia de cada una de ellas en función a su longitud de onda máxima (Seruga, Novak, & Jakobek, 2011).

Con la gráfica conseguida (que asemeja a una regresión lineal estadística), se obtiene la función matemática que representa la recta en el esquema de correlación, considerando los parámetros de absorbancia y concentración del analito, generando la siguiente ecuación, vale acotar que dentro del aspecto de análisis se considera la ley de Beer-Lamabert que relaciona absorción de luz con respecto a propiedades del material (Murtaza et al., 2011).

$$A = mc + n$$

A= Absorbancia

n= Intercepción con la recta

m= Pendiente de la recta (Absorviedad de muestra * espesor de cubeta)

Después de esto, se mide cuanto absorbe la solución problema y se interpola el valor con la gráfica con ello se genera la concentración del analito, mismo valor que debe de estar entre el rango de concentraciones usadas para la curva de calibración, en caso de generarse variantes se emplea el método de adición (Neira, 2010).

El método de adición se usa en caso de que el valor del analito sea menor a las concentraciones de calibración, se procede a adicionar muestra estándar a la concentración problema o a medir, en caso contrario donde el valor sobre pase las concentraciones halladas, se debe de diluir la sustancia en agua oxigenada (Lotfy & Hagazy, 2012). Esta técnica de análisis molecular es aplicada esencialmente al momento de medir concentraciones de sustancias disueltas en un entorno, para ello se presentan las siguientes alternativas de uso:

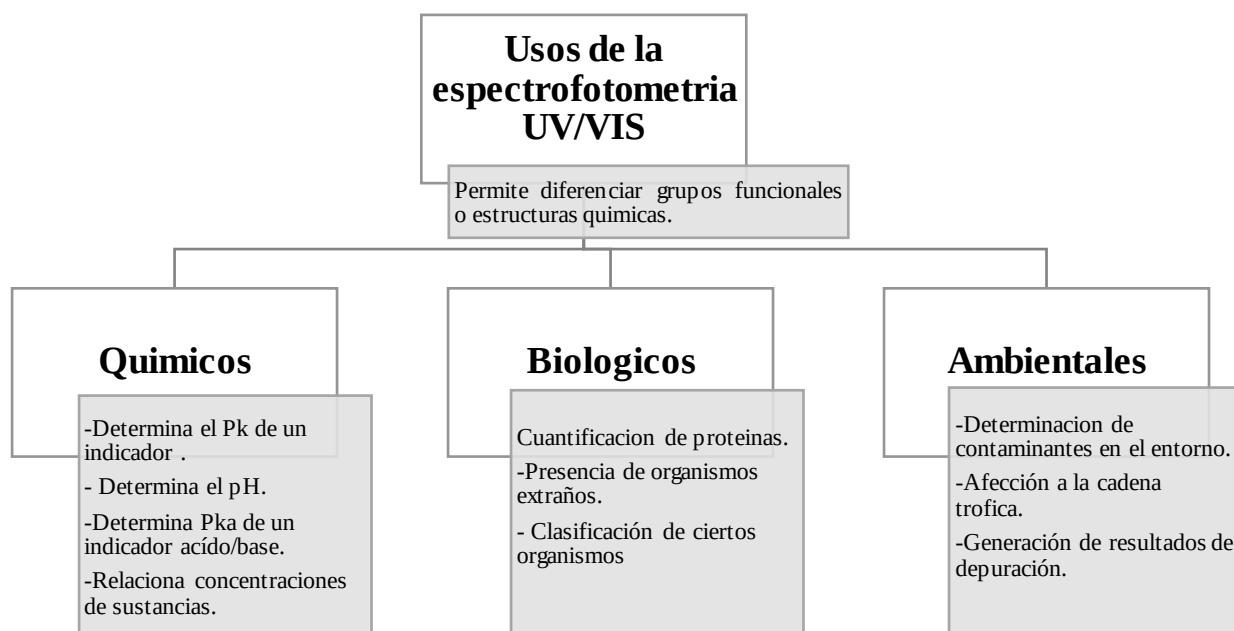


Figura 5.11 Usos de la espectrofotometría UV/VIS

Fuente: (Faraldos & Goberna, 2011)

5.1.10 Espectroscopia FTIR

La espectrofotometría FTIR se presenta como una técnica de medición que ayuda a registrar los espectros infrarrojos, mediante el uso de un interferómetro se guía a la luz a través de este y posterior sobre la muestra. Un espejo móvil distorsiona la luz en el equipo y genera una señal (interferograma), misma que muestra la salida de luz según el

espejo. Los datos que nos brinda el espectrofotómetro son tratados con la transformada de Fourier dando como resultado la salida de luz en razón de la longitud infrarroja de onda (Nizama et al., 2010).

Se lo utiliza para identificación de componentes en una muestra, considerando posibles sesgos en el uso de agua y etanol debido a la absorción dentro de los espectros IR. Dentro de este tipo de estudio se analiza la interacción entre la radiación infrarroja y la materia, esencialmente en la radiación se considera una específica longitud de onda que se absorbe por una molécula en estado de excitación en la misma longitud de onda inicial, modificando la vibración total (Cortez, 2000).

El fundamento del proceso se basa en un análisis infrarrojo (IR) y en la corrección de datos mediante transformada de Fourier que transforma la salida del detector en un espectro cuantificable (FT), donde se estudia la emisión o absorción de energía radiante que procede de la interacción entre energía electromagnética y la masa en estudio. Las moléculas pueden vibrar en múltiples frecuencias lo cual puede ser captado por el equipo, la lentitud de estudio de los infrarrojos se encuentra entre los 10 a 12500 nm (Stashenko & Martínez, 2010).

El sistema utiliza interferometría para registrar información en un haz de IR, Fourier genera espectros cuantificables en función de patrones o “huellas digitales”. Esencialmente existen cuatro técnicas o métodos dentro del análisis por FTIR (Bradley, 2012).

5.1.10.1 FTIR por transmisión:

Se establece como un método aplicado preferencialmente en análisis cuantitativos y para cuando las muestras sean de mayor complejidad debido a la

sensibilidad del analito, son utilizadas en muestras de tipo sólidas y líquidas no completamente acuosas

5.1.10.2 *Reflexión total atenuada ATR-FTIR:*

La muestra se encuentra en contacto con el cristal, es un método rápido y simple, es aplicada principalmente para el estudio o identificación de grupos orgánicos y para la naturaleza química de los óxidos.

5.1.10.3 *Reflexión especular:*

Se procede en primeras instancias a la disolución de la muestra en una matriz de control, donde la mezcla debe de estar completamente diluida. Considera la simetría de la reflexión de la luz incidente, principalmente usados para muestras con poca radiación.

5.1.10.4 *Reflectancia difusa:*

La muestra debe ser reflexiva, pero las señales de información pueden ser débiles al momento de la transmisión. Gracias al empleo de espejos planos y elípticos que permiten recolectar gran parte de la luz difusa.

Entre las aplicaciones directas de este equipo se encuentra:

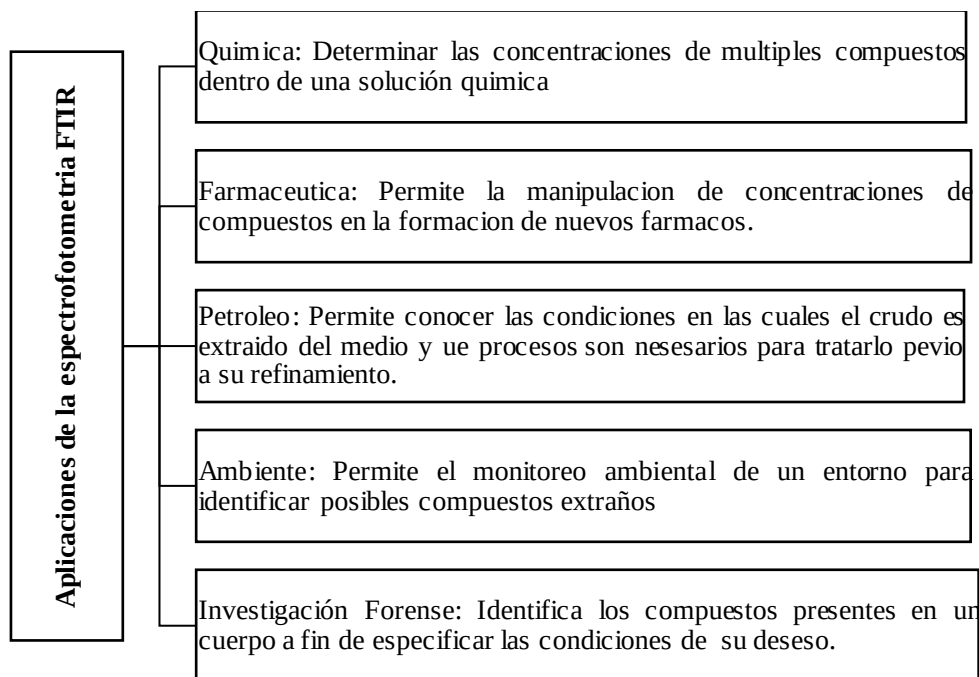


Figura 5.12 Aplicaciones de la espectrofotometría FTIR

Fuente: (Stashenko & Martínez, 2010)

5.1.11 Cromatografía de Gases

Este proceso de análisis se proyecta como un sistema físico de separación con el fin de caracterizar mezclas complejas, su principio de funcionamiento considera las características de una sustancia específica y lo separa del medio de análisis. Primordialmente este proceso tiene como inicio una fase móvil que consiste en trasladar la sustancia a través de una fase estacionaria que por lo general es un sólido o líquido (Parrales, Reyes Vera, & Pine Tobar, 2012).

A través un sistema cíclico, los componentes de la fase móvil (gas), atraviesan la fase sólida continuamente y son atrapados y cuantificados gracias a una señal láser que analiza el compuesto (Parrales et al., 2012).

En el proceso de cromatografía de gases la muestra se volatiliza e ingresa en una columna cromatográfica, este procedimiento de paso de la sustancia para el análisis se

denomina “Elusión”, mismo que comprende el flujo en fase móvil del gas que no interactúa con el analito, todo ello transportado gracias al gas transportador que por lo general es helio o nitrógeno (Núñez, Meas, Ortega, & Olguin, 2004).

Existen dos tipos de cromatografía de gases: las de GAS-SOLIDO (se adsorben los componentes de la muestra en el compuesto solido de la fase estacionaria) y GAS-LIQUIDO (comprende la vaporización de las sustancias de la muestra y que pasan por una fase estacionaria liquida) (Stashenko & Martínez, 2010).

El equipo de cromatografía de gases, como se puede observar en la figura 5.13, radica en una serie de módulos ensamblados que permiten el paso del gas y análisis del mismo en retención con la fase estática, con el objetivo de cumplir aspectos tales como un flujo del gas transportador (fase móvil), ingreso de gases de muestra, contención en la fase estacionaria, control de temperatura (volatilidad de los gases), detectar los componentes en la elución del proceso y finalmente generar los datos a investigar (Stashenko & Martínez, 2010).

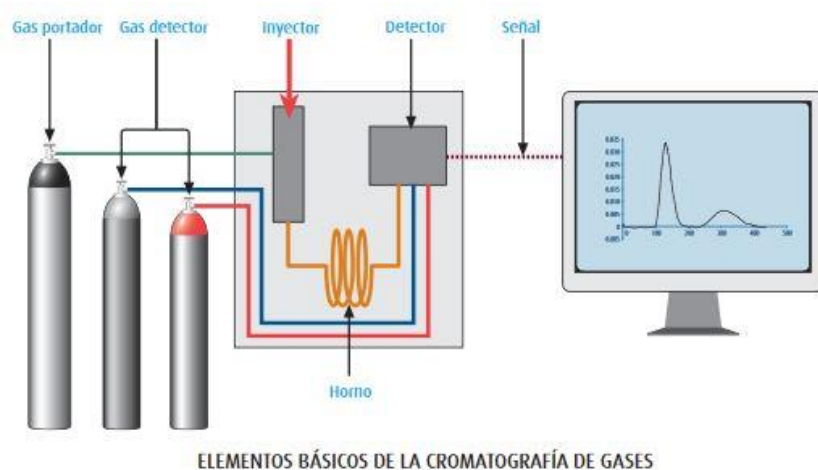


Figura 5.13 Equipos para cromatografía de gases

Fuente: (Abelló Linde, n.d.)

La columna que sirve para separar las muestras por acción electromagnética de las moléculas, suele ser principalmente de dos tipos, empaquetadas y capilares, además se debe tener la consideración que la temperatura influye en el proceso pues puede cambiar las condiciones naturales de la muestra. Los detectores deben de ser de alta sensibilidad, estables, fácil reposición entre otros. (Linde, 2010).

Entre los métodos utilizados dentro de cromatografía de gases de se encuentra el de análisis cualitativo y el de coincidencia:

5.1.11.1 *Método de Análisis Cualitativo:*

La mayor ventaja de la cromatografía de gases es la generación de información como el alto y ancho de los picos en el cronograma (especifican el tipo de sustancia encontrada), considerando un proceso óptimo de análisis se puede caracterizar inicialmente la sustancia gracias a la posición de los picos, pero ello tiende a ser ambiguo por lo cual se plantea el uso complementario de técnicas de múltiples parámetros como espectrometría de masas o infrarrojo (Olguin Perez & Rodriguez Magadan, 2004).

5.1.11.2 *Método de Análisis por Coincidencia:*

Este procedimiento consiste en comparar los volúmenes de retención de la sustancia a estudiar, con relación a un patrón determinado en similares condiciones de operación y columna de inyección. Se debe mantener constantes las condiciones de análisis lo cual resulta complicado, por ello se plantea como solución colocar al patrón como un indicador del problema y comprobar si no coincide con los picos originales. Si se genera un aumento de la altura en un pico, ello evidencia coincidencia de volúmenes

de retención, pero considerando que la técnica puede generar sesgos con compuestos nunca antes evaluados (Olguin Perez & Rodriguez Magadan, 2004).

Entre las aplicaciones más comunes en donde interviene la cromatografía de gases están:

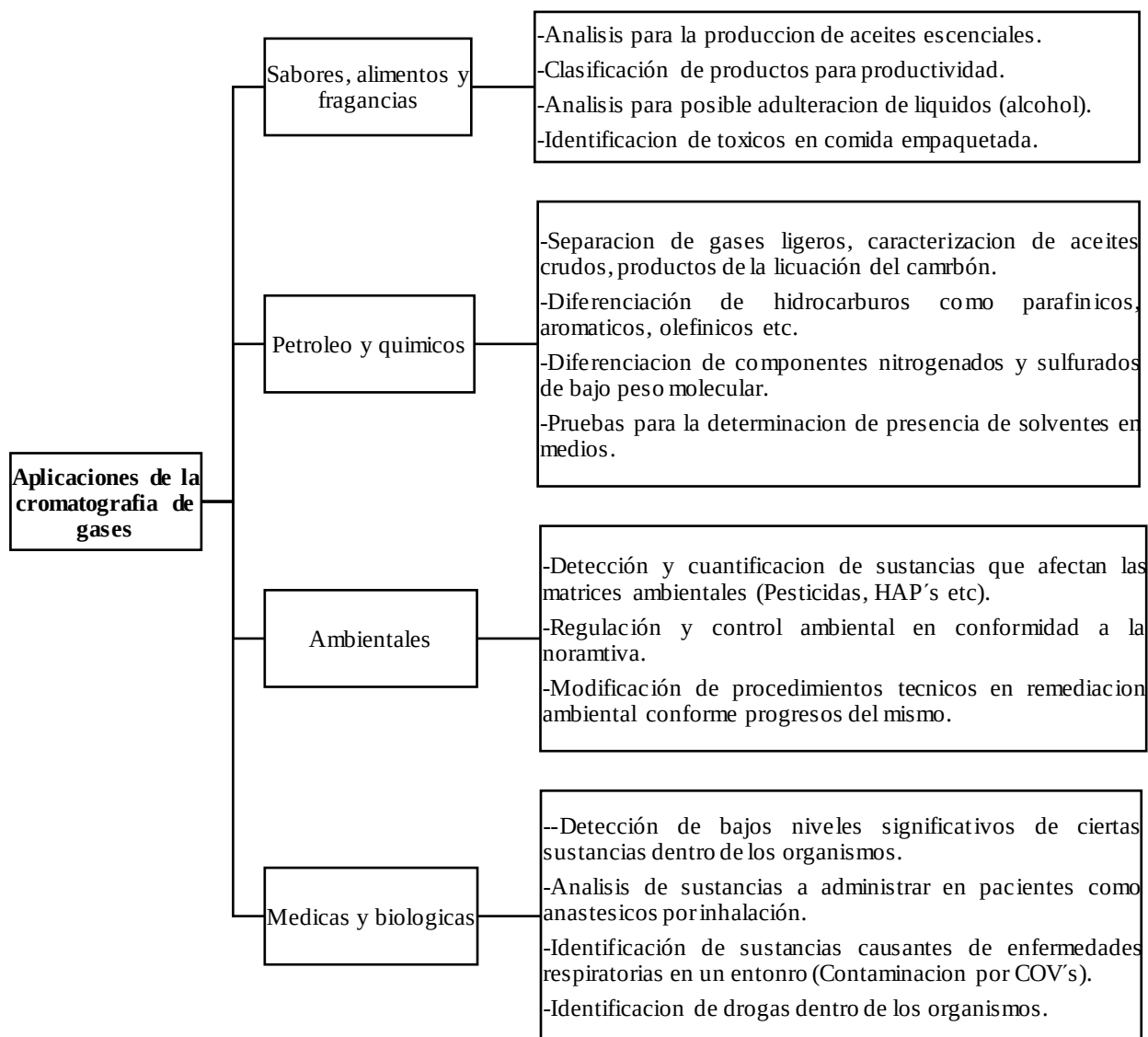


Figura 5.14 Usos de la cromatografía de gases dentro de múltiples campos

Fuente: (Olguin Perez & Rodriguez Magadan, 2004)

5.2 METODOLOGÍA

El presente proyecto de investigación se realizó por fases: primero se llevó a cabo la caracterización de la materia prima, se la lavo y secó. La fase de pretratamiento consistió en la obtención de celulosa en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana. En la primera y segunda fase se obtuvo glucosa mediante una hidrólisis ácida y una hidrólisis enzimática respectivamente. En la tercera fase se realizó la fermentación anaerobia de la glucosa para formar alcohol por medio de levaduras en un biorreactor. Y en la cuarta y última fase se realizó una caracterización físico química del alcohol obtenido.

5.2.1 Experimental:

5.2.1.1 Materia prima e insumos

La cascarilla de arroz utilizada durante esta investigación fue suministrada por la “Arrocera Sucúa”. Las condiciones que posee Morona Santiago para el cultivo de arroz son idóneas, con respecto a la temperatura y precipitaciones.

La cascarilla de arroz fue recogida de la piladora Sucúa y transportada hasta el laboratorio de ingeniería ambiental de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Cuenca. En la universidad se determinaron ciertas características de la misma como el porcentaje de humedad, capacidad de retención de agua, porcentaje de cenizas, pruebas granulométricas, solubilidad en agua caliente, solubilidad en hidróxido de sodio, porcentaje de lignina, porcentaje de celulosa y porcentaje de hemicelulosa.

5.2.1.2 Caracterización de Materias Primas y Productos de Reacción:

Se realizó un análisis proximal químico donde consta la determinación de la humedad, cenizas, solubilidad en agua y en hidróxido de sodio y la composición química. Todo esto se realizó a altas temperaturas y con diferentes concentraciones de ácido sulfúrico.

5.2.1.3 Obtención de la celulosa

Se lavó con agua caliente la muestra, con el objetivo de retirar impurezas contenidas en la cascarilla de arroz, aumentando con esto la susceptibilidad de la materia para obtener un sustrato lignocelulósico reactivo que sea altamente accesible al ataque químico, microbiológico y enzimático.

5.2.1.4 Hidrólisis Ácida.

La cascarilla de arroz fue pre tratada con soluciones diluidas de ácido sulfúrico según lo citado por: (Navarro & Abril, 2012). El proceso consistió en mezclar la materia prima con la solución ácida, posteriormente se separó el líquido del sólido mediante filtración al vacío, el sólido pre tratado se lavó las veces que sean necesarias hasta retirar la solución ácida y esta fue refregada pero no secada para no disminuir el rendimiento de la hidrólisis enzimática (Dagnino, Chamorro, Felissia, & Area, 2014).

5.2.1.5 Hidrólisis enzimática

Se realizó la hidrólisis enzimática de la celulosa ya conocida, luego se colocó las enzimas celulosas *de Trichoderma reesei*, y finalmente se evaluó la producción de azúcar durante 72 horas mediante Espectrofotometría y Refractometría (Dagnino et al., 2014).

5.2.1.6 Fermentación Biológica

En la fermentación biológica se realizó con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con la cual se ha tenido buenos resultados con las fibras de celulosa para producir biocombustibles renovables como el etanol (Kang'Ethe, Onono, McDermott, & Arimi, 2007). Se adiciono nutrientes a las levaduras como sulfato de amonio. La fermentación se llevará a cabo a diferentes temperaturas, tiempos, pH y cultivos.

5.2.1.7 Cuantificación

La evaluación de esta etapa se realizó mediante un Análisis Instrumental (Cromatografía de Gases CG) del etanol producido.

5.2.1.8 Pruebas Físico - Químicas del Bioetanol

Se realizó pruebas al bioetanol obtenido como: punto de inflamación y combustión, punto de ebullición, densidad, poder calorífico y tipo de alcohol.

5.2.2 Documental – Bibliográfica:

Esta investigación se realizó con argumentos científicos existentes tanto para la recolección de los residuos de la cascarilla de arroz como para el análisis del combustible obtenido.

5.3 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN

Esta investigación se desarrolló en base a investigación científica, obteniendo un biocombustible a partir de la cascarilla del arroz por medio de hidrólisis ácida, enzimática y fermentación, el análisis de este biocombustible para la fermentación de sus propiedades físico-químicas.

5.3.1 Materia Prima

5.3.1.1 Determinación del contenido de humedad de la materia prima

Para determinar el porcentaje de humedad de la cascarilla de arroz, realizamos tres pruebas cada una de 2,31 gramos, pero con diferentes lapsos de tiempo, y a la misma temperatura siguiendo el procedimiento de halógenos de humedad y fue calculada de la siguiente manera:

$$\%H = \frac{(B - A) - (C - A)}{(B - A)} \times 100$$

Ecuación 1

En donde:

A= peso del crisol seco

B= peso del crisol + muestra húmeda

C= peso del crisol + muestra seca

Después de tres días, se midió el nuevo porcentaje de humedad de la muestra en un halógeno de humedad, dándonos una humedad de alrededor del 7%.

5.3.1.2 Prueba granulométrica de la materia prima

Según (Serrano & Borrachero, 2012) la cascarilla de arroz tiene de 1 a 2 milímetros de diámetro. Para corroborar esta información se realizó el análisis granulométrico a una muestra de 130 gramos de cascarilla de arroz en una criba vibratoria. Haciendo pasar la muestra por 7 mallas de diferentes diámetros (#8, #10, #14, #16, #18, #20 y #25).

5.3.1.3 Determinación del porcentaje de cenizas de la materia prima

Se realizó el análisis del porcentaje de cenizas que contiene la cascarilla de arroz en una mufla a 600°C por 2 horas. Se analizaron tres muestras de 1 gramo cada una, todas bajo las mismas condiciones, y fue calculado de la siguiente manera:

$$\%Cenizas = \frac{(P1 - P2)}{(P - P2)} \times 100$$

Ecuación 2

En donde:

P= peso en gramos del crisol con la muestra

P1= peso en gramos del crisol con las cenizas

P2= peso en gramos del crisol

5.3.1.4 Determinación de la solubilidad en agua de la cascarilla de arroz

Se realizaron tres ensayos con dos gramos de muestra cada ensayo, esto con el fin de tener un dato más acercado a la realidad. Se propuso colocar 2 gramos de la muestra en un tubo de 50ml a la cual se agregó agua en exceso y se dejó reposar el contenido por 24 horas, al cabo de este tiempo se determinó el contenido retenido de agua por diferencia de pesos, calculado de la siguiente manera:

$$CRA = \text{peso final de la muestra} - \text{peso inicial de la muestra}$$

Ecuación 3

5.3.1.5 Determinación de la solubilidad en hidróxido de sodio de la cascarilla de arroz

Para determinar el porcentaje de solubilidad de la cascarilla de arroz en NaOH se realizaron tres pruebas de 2 gramos cada una, con el fin de que el resultado obtenido sea lo más cercano a la realidad.

Se propuso trabajar con dos gramos de muestra previamente tamizada en una malla #14, se colocó la muestra en el Erlenmeyer de 125ml, a esta muestra se le agregó 100ml de NaOH al 1%, se colocó el Erlenmeyer en baño maría por 25 minutos, luego se agito vigorosamente el Erlenmeyer cada 10-15 y 25 minutos, se dejó enfriar por una hora, se filtró el contenido en un crisol previamente tratado, luego se lavó el residuo sucesivamente con 50ml de agua caliente y 50ml de ácido acético, se secó la muestra a 100°C hasta obtener un peso constante. Los resultados fueron calculados de la siguiente manera:

$$\%Solubilidad\ en\ NaOH = \frac{MIC - MFC}{masa\ de\ la\ muestra\ (1 - H)} \times 100$$

Ecuación 4

En donde:

MIC= masa inicial del crisol, corresponde al peso del crisol vacío

MFC= masa final del crisol, corresponde al peso del crisol con la muestra seca

H= humedad

5.3.1.6 Determinación de la solubilidad en agua caliente de la cascarilla de arroz

Para determinar el porcentaje de solubilidad en agua caliente de la cascarilla de arroz se realizaron tres pruebas de 2 gramos cada una, con el fin de que el resultado obtenido sea lo más cercano a la realidad.

Se propuso trabajar con 2 gramos de la muestra previamente tamizada en una malla #14, se colocó la muestra en un matraz y se adiciono 100ml de agua destilada, se colocó el matraz en un baño de agua en ebullición por 3 horas, se filtró el contenido en un crisol previamente tratado, se lavó el residuo con agua caliente, se dejó secar el residuo por 10 minutos a 100°C. Los resultados se calcularon de la siguiente manera:

%Solubilidad en agua caliente

$$= \frac{MIC - MFC}{masa\ de\ la\ muestra\ (1 - H)} \times 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

En donde:

MIC= masa inicial del crisol, corresponde al peso del crisol vacío

MFC= masa final del crisol, corresponde al peso del crisol con la muestra seca

H= humedad

5.3.2 Etapa de Pretratamiento

En la etapa de pretratamiento previo a la obtención de bioetanol se realizará la obtención de celulosa necesaria para los siguientes procesos como es la obtención de glucosa y posterior fermentación de la misma.

5.3.2.1 Obtención de la Celulosa presente en la cascarilla de arroz

Para la obtención de celulosa se propuso realizar un tratamiento químico utilizando ácido sulfúrico, hidróxido de sodio y cloruro de sodio. Se tomó 10 gramos de cascarilla de arroz previamente tamizada y se colocó en un vaso de 500ml, se la mezcló con H₂SO₄ al 0,4% y se lo dejó calentar por 1 hora, se filtró al vacío y se lo lavó 3

veces con 100ml de agua destilada en cada lavado, luego se agregó hidróxido de sodio al 20% y se lo calentó a 40°C por 1 hora, la muestra se filtró al vacío, se lavó la muestra 3 veces con 100ml de agua destilada en cada lavado, se aplicó NaClO al 0,5% y se lo dejó calentar hasta que blanquee (aproximadamente 4 horas), se filtró al vacío y se lo seco por 24 horas en un horno industrial a 30°C y después de 24 horas se molió la celulosa.

5.3.2.2 Determinación del porcentaje de celulosa de la cascarilla de arroz

Para determinar el porcentaje de celulosa de la cascarilla de arroz se propuso trabajar con 2 gramos de muestra, con 25ml de NaOH al 17,5%, se lo agito y dejó reposar por 30 minutos en baño maría a una temperatura de 43°C, luego se agregó 30ml de agua destilada, se agito y dejó reposar por 1 hora. Se filtró al vacío en un papel filtro lavado en una solución de 33ml de agua destilada y 25ml de la solución de NaOH al 17,5%. Luego se lavó la muestra con 30ml de agua destilada y se dejó aplicar vacío, se agregó una solución de ácido acético al 10% y después de 3 minutos se aplicó vacío, luego se lavó la muestra con 50ml de agua destilada aplicando vacío, en la estufa se colocó la muestra en una caja petri por 4 horas a 80°C y por último se determinó el porcentaje de celulosa.

El porcentaje de celulosa se lo determino gracias a la siguiente formula:

$$\%Celulosa = \frac{Por}{Po} \times 100$$

Ecuación 6

En donde:

Por= peso seco del residuo

Po= peso anhidrido de la muestra

5.3.2.3 Determinación del porcentaje de lignina de la cascarilla de arroz

Para determinar el porcentaje de lignina de la cascarilla de arroz se propuso trabajar con 2 gramos de muestra, se agregaron 15ml de H₂SO₄ al 72% a 13°C de temperatura y se agito vigorosamente durante 1 minuto. Se dejó reposar por 2 horas, con agitación frecuente a una temperatura de 19°C, la mezcla resultante se trasvaso en un matraz de 1 litro, y se diluyo la concentración del ácido a 3% adicionando 560ml de agua destilada, la mezcla se llevó a ebullición durante 4 horas, se dejó enfriar el matraz hasta que el material insoluble decanto, se filtró al vacío utilizando papel filtro, el cual fue secado previamente a 100°C, el precipitado se llevó con 500ml de agua caliente hasta quedar libre de ácido, el papel filtro y su contenido se secaron en el horno por 4 horas a 100°C y por último se determinó el contenido de lignina.

El porcentaje de lignina se lo determino gracias a la siguiente formula:

$$\%Lignina = \frac{A - B}{C} \times 100$$

Ecuación 7

En donde:

A= peso del papel filtro con la muestra húmeda

B= peso del papel filtro con la muestra seca

C= peso de la muestra seca.

5.3.3 Primera Fase

En la primera fase se realizó conversión de la celulosa a glucosa por medio de una hidrólisis ácida, posteriormente a este proceso se realizó la determinación de

azúcares reductores por medio de una prueba de DNS, con el objetivo de obtener una curva de calibración con este reactivo (DNS).

5.3.3.1 Hidrólisis Ácida

Se propuso realizar 3 pruebas bajo los mismos parámetros. Se tomó 10 gramos de la muestra y se lo mezcló con H_2SO_4 al 2% en 250ml de agua destilada. Se colocaron las 3 muestras en el autoclave para esterilizarlas, a 125°C en 1 atmósfera de presión por 3 horas (controlando la presión del autoclave). Se dejó enfriar las muestras por 1 hora y se les realizó pruebas de Fehling A y Fehling B (ver figura 10-1 Anexo 1) con el objetivo de saber si existe o no glucosa en la hidrólisis ácida realizada, obteniendo los siguientes resultados:

Posteriormente a este proceso se realizó la determinación de azúcares reductores mediante la prueba de DNS, se trabajó con 1 gramo de DNS, 1 gramos de NaOH y 0,1 gramos de Na_2SO_4 , en 100ml de agua destilada.

Para la realización de la curva de calibración con el estándar (Glucosa). Se pesó 0,1 gramos de glucosa y se la mezcló en 90 ml de agua destilada, esta muestra es trabajada como el estándar para la realización de la curva de calibración. Se realizó una tabla (ver tabla 5-4) en donde se detalló el número de muestras, las concentraciones de la muestra patrón (estándar), los ml de agua destilada para cada muestra y los ml de DNS para cada muestra.

Utilizando la ecuación de la recta se determinó la cantidad total de glucosa en la muestra patrón.

Para la obtención de la curva de calibración con la hidrólisis ácida previamente realizada se trabajó con 6 ml de muestra de la hidrólisis ácida, posteriormente se realizó

una tabla (ver tabla 5-5) en donde se detalló el número de muestras, las concentraciones de la muestra (hidrólisis ácida), los ml DNS para cada muestra.

Utilizando la ecuación de la recta se determinó la cantidad total de glucosa en cada una de las 3 muestras de hidrólisis ácida.

5.3.4 Segunda Fase

En la segunda fase se realizó la obtención de glucosa por medio de una hidrólisis enzimática, posteriormente a este proceso se realizó la determinación de azúcares reductores por medio de una prueba de DNS, con el objetivo de obtener una curva de calibración con este reactivo (DNS).

5.3.4.1 Hidrólisis Enzimática

El objetivo de esta fase es la obtención de glucosa por medio de un proceso enzimático, para saber que la hidrólisis ácida efectivamente contiene glucosa se realizó pruebas de Fehling A y Fehling B, luego se realizó una prueba de DNS para determinar el porcentaje de glucosa en la hidrólisis ácida realizada.

Para la realización de la hidrólisis enzimática se propuso realizar 3 pruebas bajo los mismos parámetros. Se tomó 100ml de una solución Buffer con un pH de 4 para garantizar óptimas condiciones de la enzima. Se mezcló 5 gramos de celulosa con 200ml de la solución buffer y 0,25 gramos de enzima en un Erlenmeyer de 500ml. Se dejó reposar las muestras por 6 días a 50°C en una estufa. Transcurrido el tiempo de reposo se determinó si existe o no glucosa mediante las pruebas de Fehling A y Fehling B (ver figura 10-2 Anexo 2), obteniendo los siguientes resultados:

Posteriormente a este proceso se realizó la determinación de azúcares reductores mediante la prueba de DNS, se trabajó con 1 gramo de DNS, 1 gramos de NaOH y 0,1 gramos de Na₂SO₄, en 100ml de agua destilada.

Para la realización de la curva de calibración con el estándar (Glucosa) se pesó 0,1 gramos de glucosa y se la mezcló en 90 ml de agua destilada. Esta muestra es trabajada como el estándar para la realización de la curva de calibración. Se realizó una tabla (ver tabla 5-6) en donde se detalló el número de muestras, las concentraciones de la muestra patrón (estándar), los ml de agua destilada para cada muestra y los ml de DNS para cada muestra.

Para la realización de a curva de calibración con la hidrólisis enzimática previamente realizada se trabajó con 6 ml de muestra de la hidrólisis enzimática, posteriormente se realizó una tabla (ver tabla 5-7) en donde se detalló el número de muestras, las concentraciones de la muestra (hidrólisis ácida), los ml DNS para cada muestra.

Utilizando la ecuación de la recta se determinó la cantidad total de glucosa en cada una de las 3 muestras de hidrólisis enzimática.

5.3.5 Tercera Fase

En la tercera fase, se realizó la fermentación biológica de las 6 muestras (3 muestras de la hidrólisis ácida y 3 muestras de la hidrólisis enzimática) anteriormente obtenidas en la primera y segunda fase, por siete días utilizando cultivos de levaduras la misma que se dejó desarrollar en un biorreactor.

5.3.5.1 Fermentación Alcohólica

Para la realización de la fermentación biológica se sembraron cultivos de *saccharomyces cerevisiae*, las mismas que se desarrollaron en un biorreactor.

Un biorreactor es un recipiente cilíndrico, de vidrio o acero inoxidable con el fin de esterilizar y poder controlar la temperatura en el mismo. Esta cubierto por una platina compuesta por entradas y salidas que sirven para agregar substratos, nutrientes y sustancias como ácidos y bases, o extraer muestras para realizar análisis, es por ello que es el elemento central de la fermentación alcohólica (Dacosta, 2007).

Para la fermentación de las muestras se trabajó con un pH entre 4,5-6 y una temperatura de 38-50°C, por siete días en el biorreactor. Se mantuvo en el biorreactor por 7 días controlando las condiciones anteriormente mencionadas ya que son esenciales para el crecimiento de la levadura y posterior fermentación de la glucosa.

Al cabo de siete días, se midieron los grados brix de cada muestra como se muestra en la tabla 5-8 y 5-10.

Posteriormente al proceso de fermentación se realizó la destilación alcohólica en un rota vapor de cada una de las muestras fermentadas, con el fin de obtener alcohol, para este ser analizado y caracterizado en la siguiente fase.

5.3.6 Cuarta Fase

Esta es la última etapa de la investigación, la misma que consistió en la realización de 6 procesos para determinar diferentes características físico químicas del alcohol.

- Conocer el tipo de alcohol obtenido en cada una de las seis muestras mediante espectroscopia FT –IR.
- Cuantificar la cantidad de alcohol obtenido en cada una de las seis muestras, mediante cromatografía de gases.
- Conocer el punto de inflamación y combustión, el punto de ebullición, la densidad y el poder calorífico de cada una de las seis muestras de alcohol obtenidas.

Para la determinación del poder calorífico se siguió un método práctico mediante el empleo de calorímetros, los mismos que permiten determinar el poder calorífico del alcohol de forma directa en un laboratorio. Se siguió lo citado por (FERNANDEZ, 2018)

Para identificar el tipo de alcohol obtenido en esta investigación se realizó la “Prueba de Lucas” a las muestras de alcohol obtenidas. Esta prueba consiste en adicionar el reactivo de Lucas a la muestra de alcohol para verificar si esta muestra se separa en otra fase de la mezcla. Los alcoholes terciarios reaccionan inmediatamente, los alcoholes secundarios demoran entre 5-20min y los alcoholes primarios reaccionan despacio. (OLAYA QUEREVALÚ, n.d.)

Para determinar el punto de inflamabilidad y combustión se siguió el método de “La copa abierta de Cleveland”, según la Norma ASTM D56-05 (re aprobado 2010).

Este método consiste en la utilización de un equipo manual, para los líquidos cuya viscosidad sea inferior a $5,5 \text{ mm}^2/\text{s}$ (cst) a 40°C . Según lo citado por (Moncayo, 2016)

5.4 ANÁLISIS LOS RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS APLICADAS

5.4.1 Materia Prima

Se realizaron diferentes análisis preliminares a la materia prima (cascarilla de arroz) todos ellos necesarios para su posterior utilización.

5.4.1.1 Humedad

En cuanto a la determinación del porcentaje de humedad que contiene la cascarilla de arroz se realizaron tres pruebas ejecutadas con la Ecuación 1, se encontró que el porcentaje de humedad de la muestra es de alrededor del 7%, como se puede observar en la tabla 5-2.

5.4.1.2 Granulometría

La prueba granulométrica se lo realizó una sola vez, logrando determinar que el número de grano de la cascarilla de arroz proporcionada es de 1,40mm ya que se retuvo una mayor concentración (77,12 gramos) en el tamiz #14 con diámetro correspondiente a 1,40mm.

A continuación, se detalla el análisis granulométrico:

Tabla 5-1. Análisis granulométrico a 130 gramos de cascarilla de arroz.

Fuente: Autor

Número de tamiz	Diámetro del tamiz	Gramos retenidos
Tamiz #8	2,36 mm	3,6
Tamiz #10	2,00mm	26,69

Tamiz #14	1,40mm	77,12
Tamiz #16	1,18mm	6,10
Tamiz #18	1,00mm	6
Tamiz #20	850um	3,57
Tamiz #25	710um	1,92
Base	-----	5,09
TOTAL		130

5.4.1.3 Cenizas

En cuanto a la determinación del porcentaje de cenizas que contiene la cascarilla de arroz se realizaron tres pruebas ejecutadas con la Ecuación 2. El contenido de cenizas que se obtuvo en las tres pruebas fue de 20%, como se muestra en la tabla 5-2.

5.4.1.4 Solubilidad en agua

En cuanto a la determinación de solubilidad en agua que puede alcanzar la cascarilla de arroz se realizaron tres pruebas ejecutadas con la Ecuación 3. Es decir, la capacidad de retención de agua es de aproximadamente 6,6(%) como se muestra en la tabla 5-2.

5.4.1.5 Solubilidad en hidróxido de sodio

En cuanto a la determinación de la solubilidad en hidróxido de sodio que puede alcanzar la cascarilla de arroz se realizaron tres pruebas ejecutadas con la Ecuación 4. Se determinó que el porcentaje de en hidróxido de sodio es de 22,67% aproximadamente, como se muestra en la tabla 5-2.

5.4.1.6 Solubilidad en agua caliente

En cuanto a la determinación de la solubilidad en agua caliente que puede alcanzar la cascarilla de arroz se realizaron tres pruebas ejecutadas con la Ecuación 5. Se determinó que el porcentaje de solubilidad en agua caliente es de aproximadamente 26,08%, como se muestra en la tabla 5-2.

En la tabla 3, se presenta un resumen de los resultados obtenidos a través de los diferentes análisis realizados a las muestras de cascarilla de arroz.

Tabla 5-2. Resumen de los resultados obtenidos en la caracterización de la materia prima.

Fuente: Autor

Componente	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
Humedad	6,85%	6,55%	6,58%
Granulometría	1,40mm	-----	-----
Cenizas	20 %	20 %	20 %
Solubilidad en Agua	5,52 %	8,36 %	5,92 %
Solubilidad en Hidróxido de Sodio	25,04 %	21,83 %	21,14 %
Solubilidad en Agua Caliente	23,09 %	29,09 %	20,06 %

5.4.2 Pre tratamiento

A continuación, se detallan los resultados en cuanto a la obtención y pureza de la celulosa, el porcentaje que existe en la muestra de cascarilla de arroz tanto de lignina como de celulosa.

5.4.2.1 Obtención de Celulosa presente en la cascarilla de arroz

Los resultados obtenidos mediante un análisis con el espectrofotómetro IR son los siguientes: El pico $3331,38\text{ cm}^{-1}$ hace referencia a una amina secundaria ancha y muy pequeña en N-heterociclos, en el pico $2894,54$ se origina de un estiramiento de OH (señal ancha por puente de hidrógeno). El pico $1635,93\text{ cm}^{-1}$ nos indica una señal intensa que se origina por un estiramiento del grupo carbonilo dentro de un anillo de la celulosa, el pico $1421,67\text{ cm}^{-1}$ hace referencia a estiramiento del carboxilo, el pico $1369,93\text{ cm}^{-1}$ nos indica que existen vibraciones con intensidad alta, el pico $1157,03\text{ cm}^{-1}$ nos muestra un estiramiento simétrico y asimétrico de los enlaces del Alquil ester, el pico $1024,41\text{ cm}^{-1}$ nos indica que existen vibraciones con intensidad media, en el pico $896,13\text{ cm}^{-1}$ existe ligera presencia de lignina, debido a que no se sometió la materia prima a un lavado con agua caliente, el pico 485 cm^{-1} nos indica que existen vibraciones con una intensidad media. Todo esto se encuentra representado en la figura 5.15.

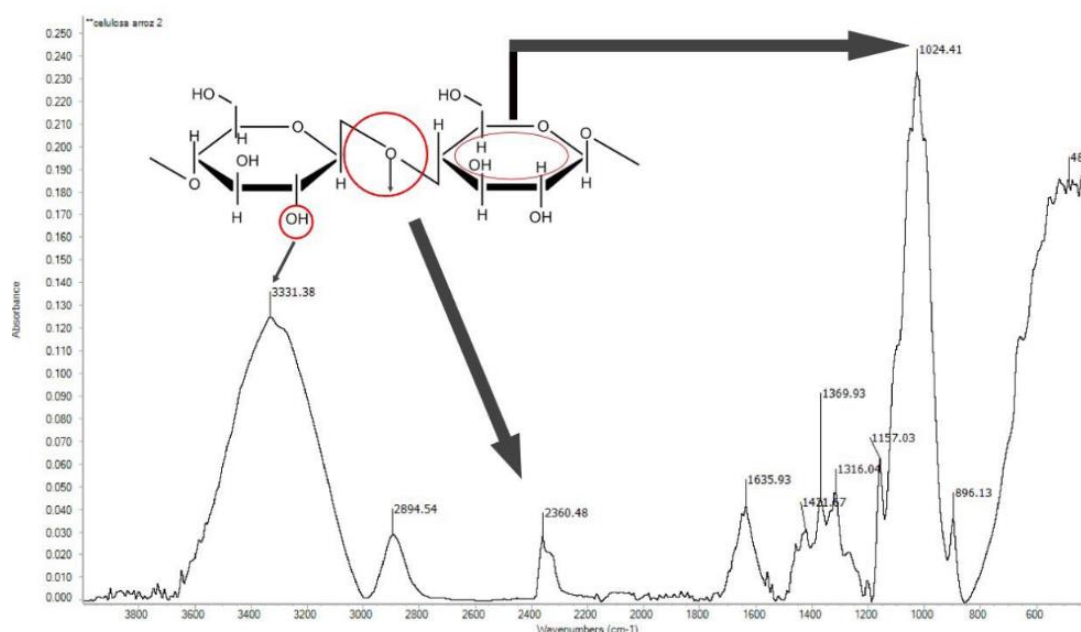


Figura 5.15 Celulosa de la cascarilla de arroz.

Fuente: Autor

También se realizó una comparación de la celulosa obtenida en la investigación con una muestra de celulosa estándar como se muestra en la figura 5.16, en donde podemos ver la similitud del 90% entre las dos muestras (celulosa obtenida y celulosa estándar).

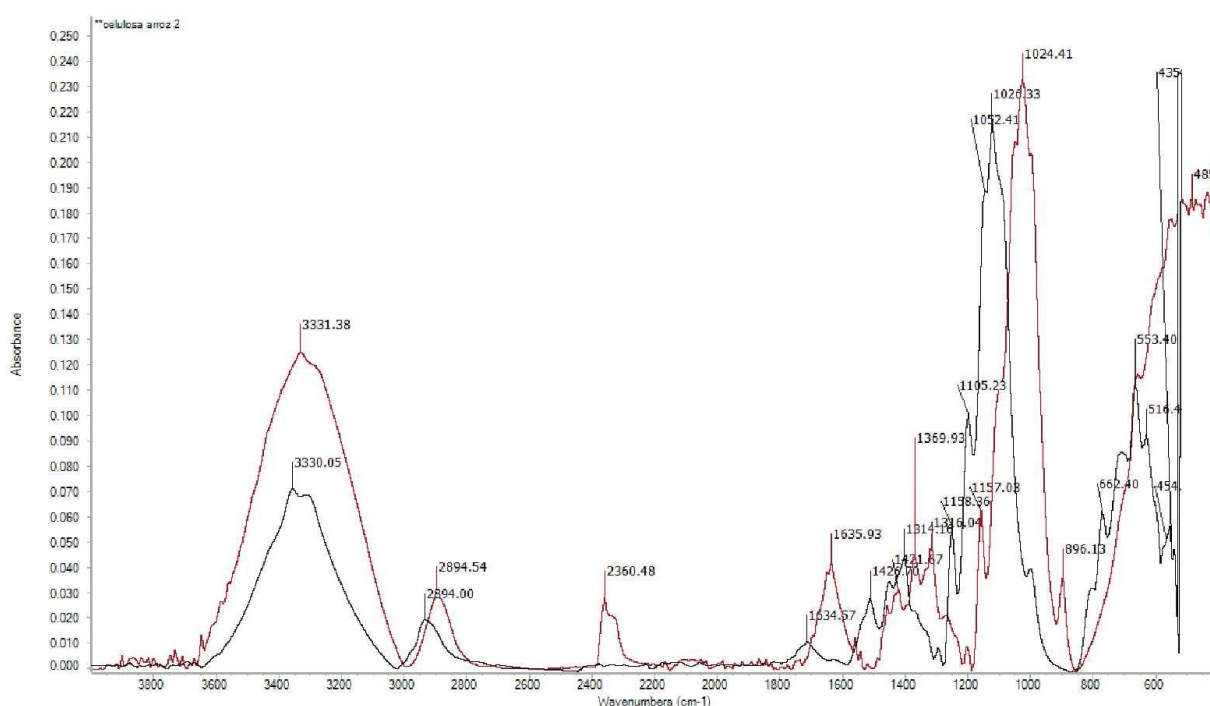


Figura 5.16 Comparación entre celulosa estándar (color negro) y celulosa obtenida de la cascarilla de arroz (color rojo).

Fuente: Autor

5.4.2.2 Porcentaje de Celulosa presente en la cascarilla de arroz

El porcentaje de celulosa se lo ejecutó respecto a los parámetros de la Ecuación 6, dándonos un porcentaje de alrededor del 34%, como se muestra en la tabla 5-3.

5.4.2.3 Porcentaje de Lignina presente en la cascarilla de arroz

El porcentaje de lignina se lo ejecutó respecto a los parámetros de la Ecuación 7, dándonos un porcentaje de alrededor del 19,27%, como se muestra en la tabla 5-3.

A continuación, se detalla una tabla resumen de los porcentajes que se obtuvieron de celulosa, lignina y hemicelulosa de la cascarilla de arroz:

Tabla 5-3. Tabla resumen de la determinación del porcentaje de celulosa, lignina y hemicelulosa que contiene la cascarilla de arroz.

Fuente: Autor

Material Lignocelulósico	Porcentaje (%)
Celulosa	34
Lignina	19,27
Hemicelulosa	46,73

5.4.3 Primera Fase

En la primera fase se obtuvo glucosa en casa una de las 3 muestras, esta glucosa deriva de la hidrólisis ácida anteriormente realizada. A estas muestras se les sometió a un análisis DNS para saber la cantidad de azúcares reductores, como se muestra a continuación:

Tabla 5-4. Datos para la curva de calibración.

Fuente: Autor

Nº muestras	Muestra Patrón	ml de agua destilada	ml de DNS	Concentración	Absorbancia
0	0	2	2	0	0,129
1	0,2	1,8	2	1,25	0,355
2	0,4	1,6	2	2,5	0,718
3	0,6	1,4	2	3,75	1,101
4	0,8	1,2	2	5	1,428
5	1	1	2	6,25	1,621
6	1,2	0,8	2	7,5	1,810

7	1,4	0,6	2	8,75	1,981
8	1,6	0,4	2	10	2,182
9	1,8	0,2	2	11,25	2,278
10	2	0	2	12,5	2,372
ABSORBANCIA TOTAL					1,585

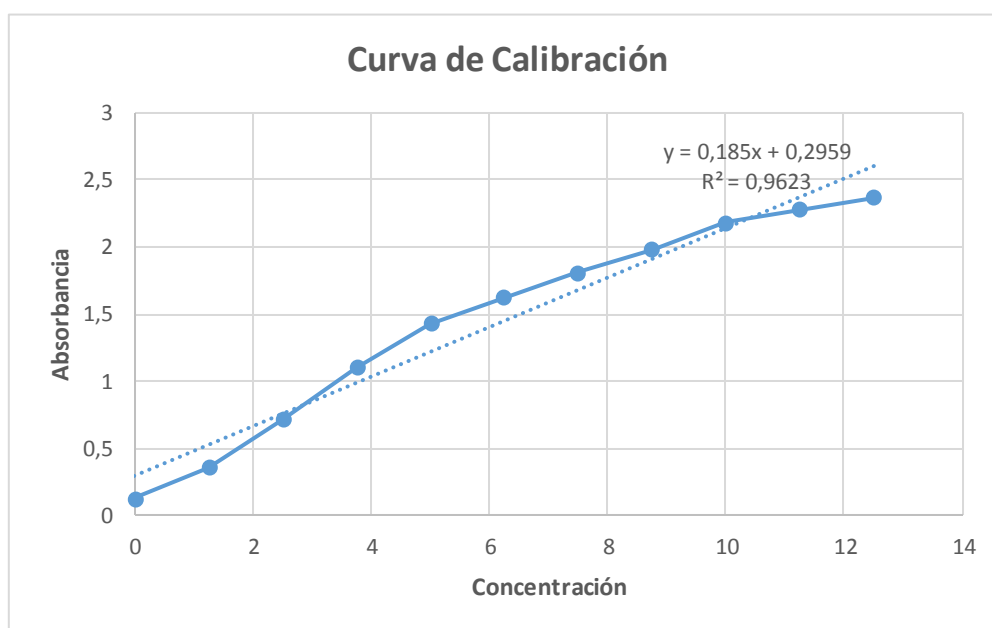


Figura 5.17 Curva de Calibración. Fuente: Autor

Utilizando la ecuación de la recta se determinó la cantidad total de glucosa en la muestra patrón.

$$Y = 0,185x + 0,2959$$

Despejamos x, teniendo en cuenta que “Y” es la absorbancia total

$$x = \frac{Y - 0,2959}{0,185}$$

$$x = \frac{1,585 - 0,2959}{0,185}$$

$$x = 6,968 \frac{g}{l}$$

Para la realización de la curva de calibración con la hidrólisis ácida previamente realizada se efectuaron los siguientes pasos:

Se trabajó con 6 ml de muestra de la hidrólisis ácida, posteriormente se realizó una tabla (ver tabla 5-5) en donde se detalló el número de muestras, las concentraciones de la muestra (hidrólisis ácida), los ml DNS para cada muestra.

Tabla 5-5. Concentraciones de las muestras (hidrólisis ácida).

Fuente: Autor

Nº muestras	Muestra Patrón (ml)	DNS (ml)	Concentración (gr)	Absorbancia
1	2	2	1,25	0,0572
2	2	2	2,5	0,1567
3	2	2	2,5	0,2755

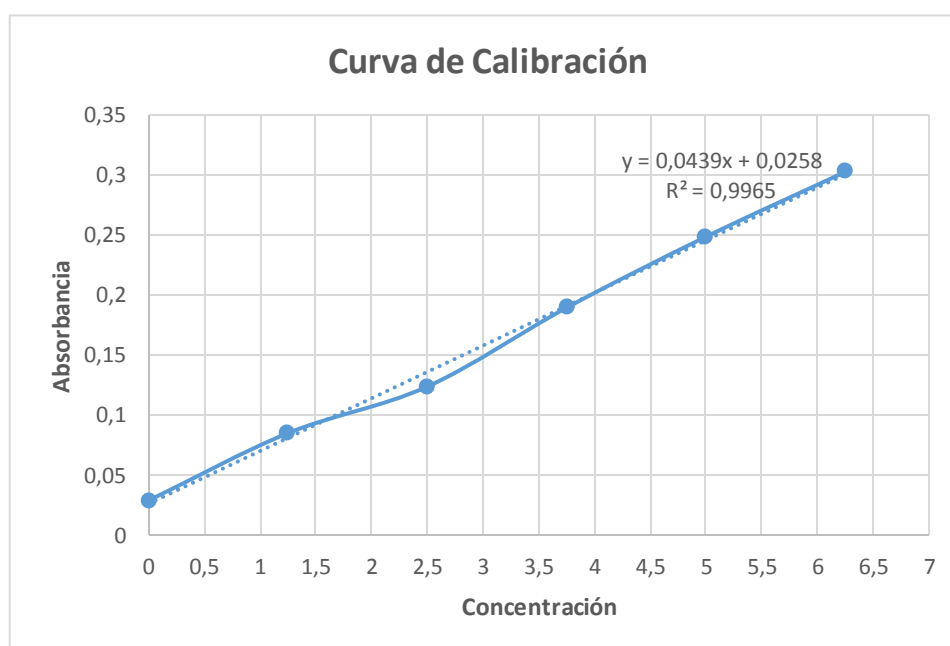


Figura 5.18 Curva de Calibración.

Utilizando la ecuación de la recta se determinó la cantidad total de glucosa en cada una de las 3 muestras de hidrólisis ácida.

Muestra 1:

$$Y = 0,0439x + 0,0258$$

Despejamos x, teniendo en cuenta que “Y” es la absorbancia total de 0,0572

$$x = \frac{Y - 0,0258}{0,0439}$$

$$x = \frac{0,0572 - 0,0258}{0,0439}$$

$$x = 0,72 \frac{g}{l}$$

Muestra 2:

$$Y = 0,0439x + 0,0258$$

Despejamos x, teniendo en cuenta que “Y” es la absorbancia total de 0,1567

$$x = \frac{Y - 0,0258}{0,0439}$$

$$x = \frac{0,1567 - 0,0258}{0,0439}$$

$$x = 2,98 \frac{g}{l}$$

Muestra 3:

$$Y = 0,0439x + 0,0258$$

Despejamos x, teniendo en cuenta que “Y” es la absorbancia total de 0,2755

$$x = \frac{Y - 0,0258}{0,0439}$$

$$x = \frac{0,2755 - 0,0258}{0,0439}$$

$$x = 5,68 \frac{g}{l}$$

5.4.4 Segunda Fase

En la segunda fase se obtuvo glucosa en casa una de las 3 muestras, esta glucosa deriva de la hidrólisis enzimática anteriormente realizada.

A estas muestras se les sometió a un análisis DNS para saber la cantidad de azúcares reductores, como se muestra a continuación:

Tabla 5-6. Datos para la curva de calibración

Fuente: Autor

Nº muestras	Muestra Patrón	ml de agua destilada	ml de DNS	Concentración	Absorbancia
0	0	2	2	0	0,169
1	0,2	1,8	2	1,25	0,266
2	0,4	1,6	2	2,5	0,614
3	0,6	1,4	2	3,75	1,009
4	0,8	1,2	2	5	1,318
5	1	1	2	6,25	1,512
6	1,2	0,8	2	7,5	1,809
7	1,4	0,6	2	8,75	1,978
8	1,6	0,4	2	10	2,171
9	1,8	0,2	2	11,25	2,273
10	2	0	2	12,5	2,362

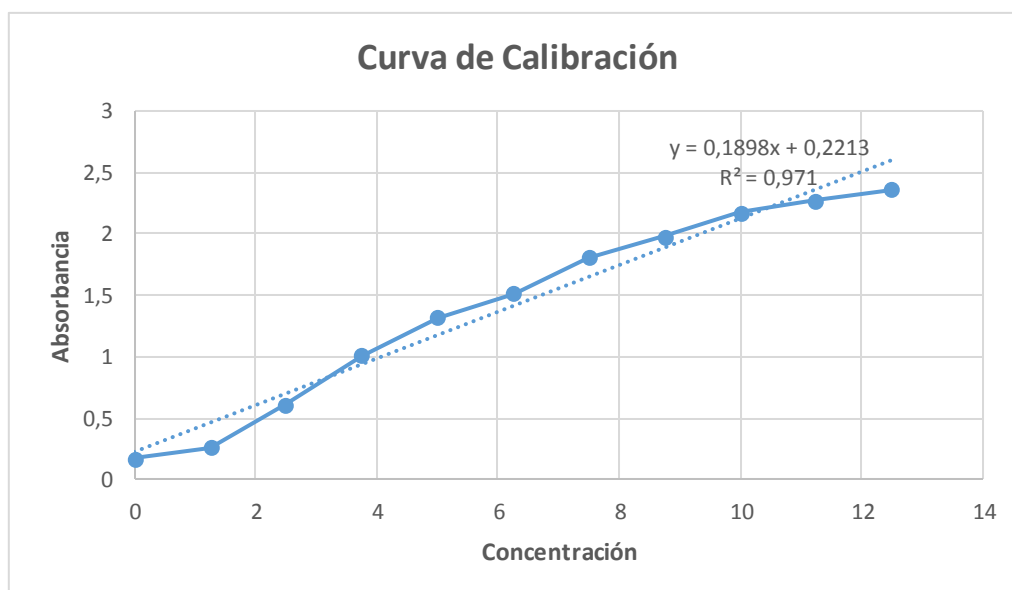


Figura 5.19 Curva de Calibración.

Fuente: Autor

Utilizando la ecuación de la recta se determinó la cantidad total de glucosa en la muestra patrón.

$$Y = 0,1898x + 0,2213$$

Despejamos x, teniendo en cuenta que “Y” es la absorbancia total

$$x = \frac{Y - 0,2213}{0,1898}$$

$$x = \frac{1,407 - 0,2213}{0,1898}$$

$$x = 6,247 \frac{g}{l}$$

Para la realización de a curva de calibración con la hidrólisis enzimática previamente realizada se efectuaron los siguientes pasos:

Se trabajó con 6 ml de muestra de la hidrólisis enzimática, posteriormente se realizó una tabla (ver tabla 5-7) en donde se detalló el número de muestras, las concentraciones de la muestra (hidrólisis ácida), los ml DNS para cada muestra.

Tabla 5-7. Concentraciones de las muestras (hidrólisis enzimática).

Fuente: Autor

Nº muestras	Muestra Patrón (ml)	DNS (ml)	Concentración (gr)	Absorbancia
1	2	2	1,25	0,064
2	2	2	2,5	0,189
3	2	2	3,75	0,288

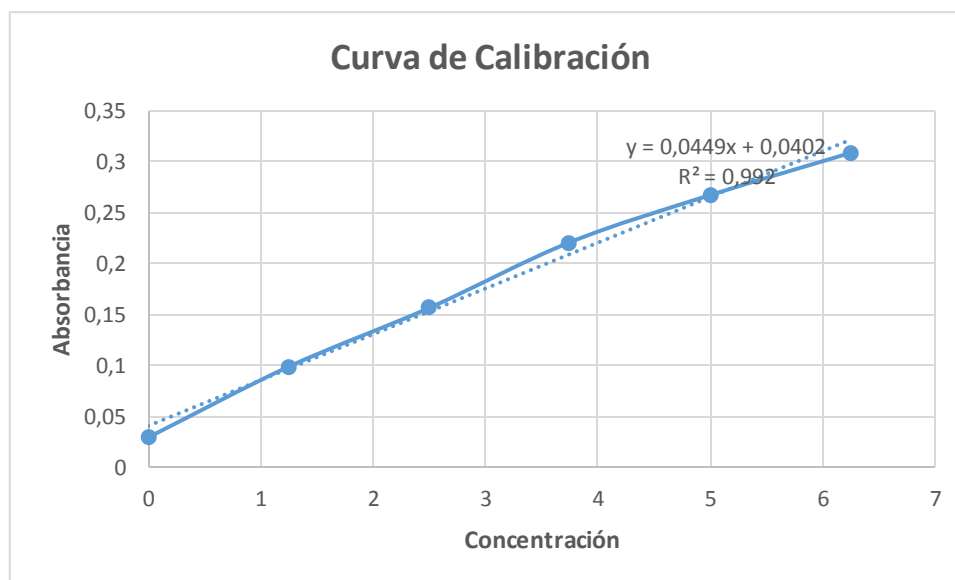


Figura 5.20 Curva de Calibración.

Fuente: Autor

Utilizando la ecuación de la recta se determinó la cantidad total de glucosa en cada una de las 3 muestras de hidrólisis ácida.

Muestra 1:

$$Y = 0,0449x + 0,0402$$

Despejamos x, teniendo en cuenta que “Y” es la absorbancia total de 0,064

$$x = \frac{Y - 0,0402}{0,0449}$$

$$x = \frac{0,064 - 0,0402}{0,0449}$$

$$x = 0,53 \frac{g}{l}$$

Muestra 2:

$$Y = 0,0449x + 0,0402$$

Despejamos x, teniendo en cuenta que “Y” es la absorbancia total de 0,189

$$x = \frac{Y - 0,0402}{0,0449}$$

$$x = \frac{0,189 - 0,0258}{0,0439}$$

$$x = 3,71 \frac{g}{l}$$

Muestra 3:

$$Y = 0,0449x + 0,0402$$

Despejamos x , teniendo en cuenta que “ Y ” es la absorbancia total de 0,288

$$x = \frac{Y - 0,0402}{0,0449}$$

$$x = \frac{0,288 - 0,0258}{0,0439}$$

$$x = 5,97 \frac{g}{l}$$

5.4.5 Tercera Fase

Los resultados que se obtuvo en la tercera fase es la fermentación alcohólica de la glucosa en cada una de las 6 muestras por siete días, en donde se determinó una fermentación casi completa de las muestras, este nivel de fermentación se midió en grados brix, los mismo que fueron bajando, eso quiere decir que mientras van bajando los grados brix se está fermentando la glucosa de las muestras.

Esta fase nos permitió tener una fermentación alcohólica derivada de la glucosa presente en cada muestra, la misma que nos da un olor característico a etanol. El alcohol obtenido en esta fase, será analizado en una cuarta fase.

A cada una de las tres muestras obtenidas mediante un proceso químico se les midió los grados brix iniciales, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 5-8. Grados brix iniciales antes de la fermentación alcohólica.

Fuente: Autor

Muestras	Grados Brix	Número de Día
Muestra 1	6,8	1
Muestra 2	5,5	1
Muestra 3	7	1

A continuación, se detallará los grados brix de las 6 muestras sometidas a fermentación medidos a los siete días obtenidas mediante un proceso químico:

Tabla 5-9. Grados brix del proceso ácido después de la fermentación.

Fuente: Autor

Muestras	Grados Brix	Número de Día
Muestra 1	0,9	7
Muestra 2	0,5	7
Muestra 3	1	7

A los siete días de reposar en un ambiente anaerobio la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, fermento las tres muestras significativamente, ya que, la muestra 1 bajo de 6,8 a 0,9 en siete días. La muestra 2 bajo de 5,5 a 0,5 en siete días y la muestra número 3 bajo de 7 a 1 grado brix.

A cada una de las tres muestras obtenidas mediante un proceso enzimático se les midió los grados brix iniciales, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 5-10. Grados brix iniciales antes de la fermentación alcohólica.

Fuente: Autor

Muestras	Grados Brix	Número de Día
Muestra 1	4,1	1
Muestra 2	4,5	1
Muestra 3	5	1

A continuación, se detallará los grados brix de las 6 muestras sometidas a fermentación medidos a los siete días obtenidas mediante un proceso enzimático:

Tabla 5-11. Grados brix del proceso enzimático después de la fermentación.

Fuente: Autor

Muestras	Grados Brix	Número de Día
Muestra 1	0,1	7
Muestra 2	0,3	7
Muestra 3	0,5	7

A los siete días de reposar en un ambiente anaerobio la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, fermentó las tres muestras significativamente, ya que, la muestra 1 bajó de 4,1 a 0,1 en siete días. La muestra 2 bajó de 4,5 a 0,3 en siete días y la muestra número 3 bajó de 5 a 0,5 grado brix.

5.5.6 Cuarta Etapa

En esta etapa se realizó un análisis de las características físico químicas de las seis muestras de alcohol obtenido, como se detallan a continuación:

Tabla 5-12. Características físico químicas de las seis muestras sometidas al proceso de análisis.

Fuente: Autor

Tipo de Análisis	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
Cantidad de Alcohol	12°	12°	12°	12°	12°	12°
Punto de Inflamación y combustión	A los 32°C	A los 32°C	A los 32°C	A los 30°C	A los 30°C	A los 30°C
Punto de Ebullición	77°C	77°C	77°C	78,5°C	78,5°C	78,5°C
Densidad	0,779 mg/L	0,774 mg/L	0,769 mg/L	0,789 mg/L	0,789 mg/L	0,789 mg/L
Poder Calorífico	11 kcal/kg	11 kcal/kg	11 kcal/kg	11,33 kcal/kg	11,33 kcal/kg	11,33 kcal/kg
Tipos de Alcohol	Alcohol Primario	Alcohol Primario	Alcohol Primario	Alcohol Primario	Alcohol Primario	Alcohol Primario
Poder calorífico SUPER	41,634 kcal/kg	-----	-----	-----	-----	-----
Poder calorífico de la mezcla	40.12 kcal/kg	-----	-----	-----	-----	-----

Los resultados obtenidos mediante un análisis del alcohol obtenido mediante un proceso ácido con el espectrofotómetro FTIR como se muestra en la figura 5.21 son los siguientes: en el pico 3300 cm^{-1} existe una banda ancha que muestra la ausencia de puentes de hidrógeno del grupo OH^- , el valor 1600 cm^{-1} es muy característico de un alcohol primario.

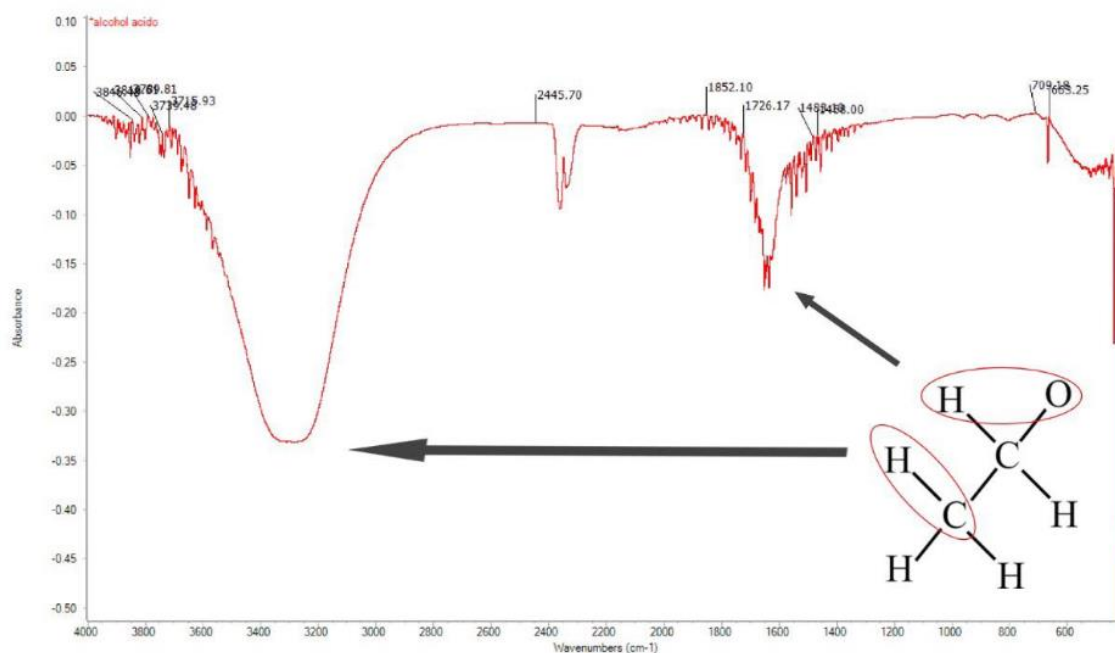


Figura 5.21 Análisis del alcohol obtenido mediante un proceso químico. Fuente: Autor

También se realizó una comparación del alcohol obtenido en la investigación con una muestra de alcohol etílico estándar como se muestra en la figura 5.22, en donde podemos ver la similitud grandes entra las dos muestras (alcohol obtenido y alcohol etílico estándar).

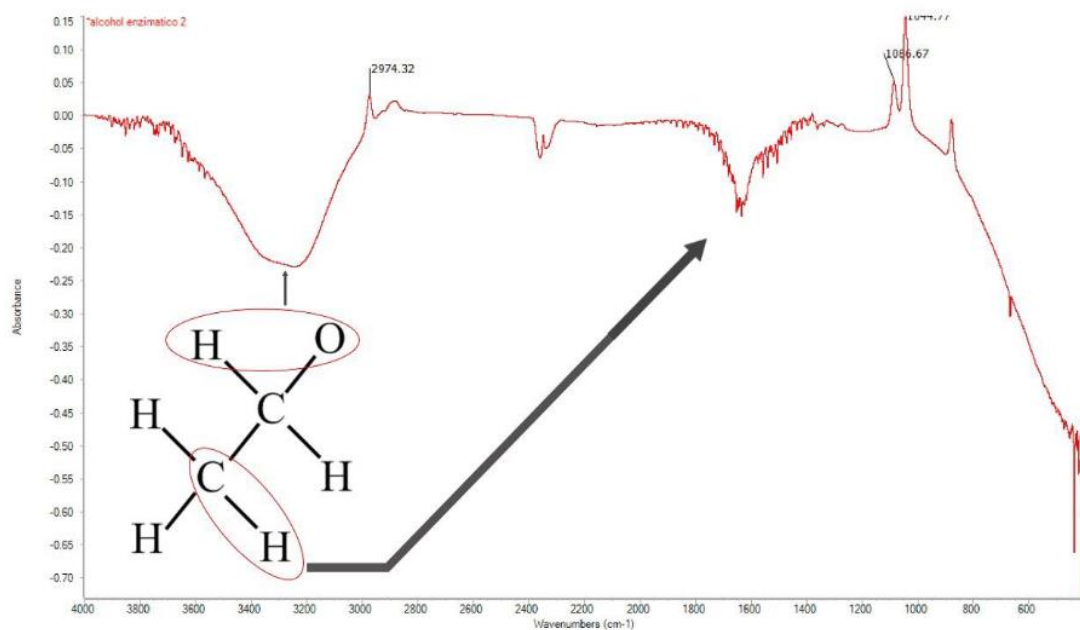


Figura 5.23 Análisis del alcohol obtenido mediante un proceso enzimático.

Fuente: Autor

También se realizó una comparación del alcohol obtenido en la investigación con una muestra de alcohol etílico estándar como se muestra en la figura 5.24, en donde podemos ver la similitud grande entre las dos muestras (alcohol obtenido y alcohol etílico estándar).

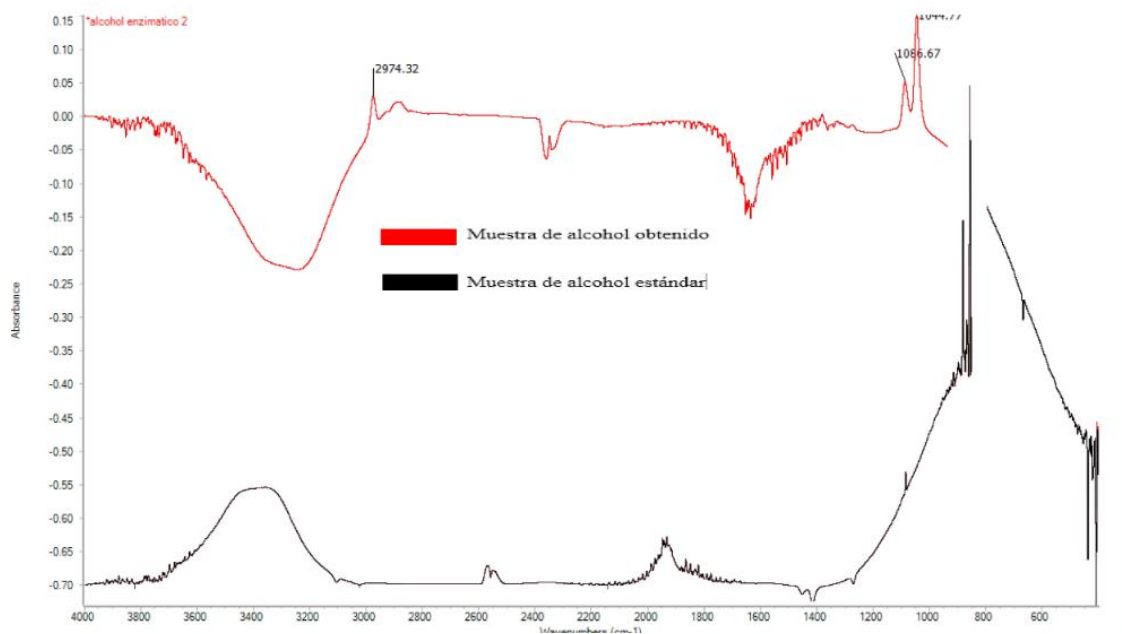


Figura 5.24 Comparación del alcohol obtenido mediante un proceso enzimático y una muestra de alcohol etílico estándar.

Fuente: Autor

5.5.7 Análisis Estadístico

En este proyecto se ha realizado la comparación entre los dos métodos de hidrólisis: ácida y enzimática, aplicando el análisis de variancia y la distribución F.

Distribución F

Esta distribución probabilística se utiliza como estadístico de prueba en varias situaciones. Se aplica cuando se desea comparar simultáneamente dos o más medias poblacionales. Dicha comparación simultánea de varias medias poblacionales se denomina análisis de variancia (ANOVA, de analysis of variance). (Mason & Lind, 1992)

La distribución F se utiliza para demostrar la hipótesis de que la variancia de una población normal es igual a la variancia de otra población normal. (Mason & Lind, 1992)

ANOVA

En este análisis se emplea información muestral para determinar si dos o más tratamientos producen o no resultados diferentes (Mason & Lind, 1992). Para este caso los diferentes tratamientos son: la hidrólisis ácida y la hidrólisis enzimática.

Para el análisis se ha desarrollado el método de prueba de hipótesis.

Hipótesis nula

H_0 expresa que no hay diferencia significativa entre la cantidad media de glucosa obtenida por los dos métodos; es decir, $\mu_1 = \mu_2$, la hipótesis alternativa, H_1 , plantea las medias son diferentes, $\mu_1 \neq \mu_2$. Si H_0 se rechaza, H_1 se aceptará.

Nivel de significación

El nivel seleccionado es 0.05

Estadístico de prueba

El estadístico de prueba adecuado es la distribución F.

Número de tratamientos $k = 2, k - 1 = 2 - 1 = 1$ *grado de libertad* del numerador

Número total de observaciones

$N = 6, N - k = 6 - 2 = 4$ *grado de libertad del denominador*

Valor crítico: revisar la tabla de valores críticos de la distribución F con los grados de libertad calculados anteriormente.

área a la derecha del valor crítico = 0,05

g.d.l	Grados de libertad del Numerador										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	236,8	238,9	240,5	241,9	243,0
2	18,513	19,000	19,164	19,247	19,296	19,330	19,353	19,371	19,385	19,396	19,405
3	10,128	9,552	9,277	9,117	9,013	8,941	8,887	8,845	8,812	8,786	8,763
4	7,709	6,944	6,591	6,388	6,256	6,163	6,094	6,041	5,999	5,964	5,936
5	6,608	5,786	5,409	5,192	5,050	4,950	4,876	4,818	4,772	4,735	4,704
6	5,987	5,143	4,757	4,534	4,387	4,284	4,207	4,147	4,099	4,060	4,027
7	5,591	4,737	4,347	4,120	3,972	3,866	3,787	3,726	3,677	3,637	3,603
8	5,318	4,459	4,066	3,838	3,687	3,581	3,500	3,438	3,388	3,347	3,313
9	5,117	4,256	3,863	3,633	3,482	3,374	3,293	3,230	3,179	3,137	3,102
10	4,965	4,103	3,708	3,478	3,326	3,217	3,135	3,072	3,020	2,978	2,943
11	4,844	3,982	3,587	3,357	3,204	3,095	3,012	2,948	2,896	2,854	2,818
12	4,747	3,885	3,490	3,259	3,106	2,996	2,913	2,849	2,796	2,753	2,717
13	4,667	3,806	3,411	3,179	3,025	2,915	2,832	2,767	2,714	2,671	2,635
14	4,600	3,739	3,344	3,112	2,958	2,848	2,764	2,699	2,646	2,602	2,565
15	4,543	3,682	3,287	3,056	2,901	2,790	2,707	2,641	2,588	2,544	2,507
16	4,494	3,634	3,239	3,007	2,852	2,741	2,657	2,591	2,538	2,494	2,456
17	4,451	3,592	3,197	2,965	2,810	2,699	2,614	2,548	2,494	2,450	2,413
18	4,414	3,555	3,160	2,928	2,773	2,661	2,577	2,510	2,456	2,412	2,374
19	4,381	3,522	3,127	2,895	2,740	2,628	2,544	2,477	2,423	2,378	2,340
20	4,351	3,493	3,098	2,866	2,711	2,599	2,514	2,447	2,393	2,348	2,310
21	4,325	3,467	3,072	2,840	2,685	2,573	2,488	2,420	2,366	2,321	2,283
22	4,301	3,443	3,049	2,817	2,661	2,549	2,464	2,397	2,342	2,297	2,259
23	4,279	3,422	3,028	2,796	2,640	2,528	2,442	2,375	2,320	2,275	2,236
24	4,260	3,403	3,009	2,776	2,621	2,508	2,423	2,355	2,300	2,255	2,216
25	4,242	3,385	2,991	2,759	2,603	2,490	2,405	2,337	2,282	2,236	2,198

Figura 5.25 Tabla de valores críticos distribución F, nivel de significación 0.05 Fuente: <http://www.mat.uda.cl/hsalinas/cursos/2008/probabilidad/TablaF05.pdf>

El valor crítico para este caso es **7.709**

Al usar el nivel de 0.05, la regla de decisión es aceptar la hipótesis nula H_0 si el valor calculado de F es menor que o igual a 7.709; se rechaza H_0 y se acepta H_1 si el valor calculado de F es mayor que 7.709.

Calcular F y tomar una decisión

Tabla 5-13. Descriptivos para cálculo de valor F. Fuente: Autor, software SPSS

DESCRIPTIVOS									
GLUCOSA									
	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo	Varianza entre- componente
					Límite inferior	Límite superior			
Hidrólisis ácida	3	3,1267	2,48325	1,43371	-3,0421	9,2954	,72	5,68	
Hidrólisis enzimática	3	3,4033	2,73293	1,57786	-3,3857	10,1923	,53	5,97	
Total	6	3,2650	2,34033	,95544	,8090	5,7210	,53	5,97	
Modelo	Efectos fijos		2,61108	1,06597	,3054	6,2246			
	Efectos aleatorios			1,06597 ^a	-10,2794 ^a	16,8094 ^a			-2,23431
a. Advertencia: la varianza entre componente es negativa. Fue sustituida por 0,0 en el cálculo de esta medida de efectos aleatorios.									

Tabla 5-13. Tabla ANOVA

Fuente: Autor, software SPSS

ANOVA					
GLUCOSA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
Entre grupos	,115	1	,115	,017	,903
Dentro de grupos	27,271	4	6,818		
Total	27,386	5			

La regla de decisión indica que, si el valor calculado de F es menor que o igual al valor crítico de 7.709, la hipótesis nula se acepta. Puesto que $0.017 < 7.709$, la hipótesis nula se acepta al nivel 0.05, en otras palabras, las diferencias en la cantidad media de glucosa por los dos métodos se atribuyen al azar(muestreo). Desde un punto de vista práctico no puede, los niveles de glucosa obtenidos por los dos métodos son iguales. No se puede definir una superioridad de uno u otro método, con base en los niveles de glucosa obtenidos.

6 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

- En el análisis físico químico de la materia prima se obtuvieron resultados muy similares a los resultados de análisis realizados en otras investigaciones con la cascarilla del arroz. Sin embargo, debido a que el porcentaje de humedad de la cascarilla de arroz usada en el presente proceso era alto para poder utilizarse directamente. Se sometió a un tiempo de secado de la muestra de 3 días a 70°C logrando disminuir su contenido de humedad de 14% a 7%.

- Para la obtención de glucosa contenida en la celulosa que se extrajo en esta investigación, se utilizaron dos procesos de hidrólisis. En la primera hidrólisis, mediante la utilización de ácido sulfúrico (hidrólisis ácida), se obtuvo glucosa de las tres muestras sometidas a este proceso. Pero las cantidades de glucosa obtenidas en cada una de estas muestras fueron inferiores en comparación con las otras tres muestras sometidas a una hidrólisis mediante el hongo *trichoderma risee* (hidrólisis enzimática).
- La fermentación de la glucosa es exitosa siempre y cuando cualquier levadura se desarrolle en un biorreactor entre 5 y 7 días, ya que el mismo proporciona las características óptimas para realizar correcta y eficientemente su proceso de fermentación. En este caso, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es altamente eficiente en la conversión de la glucosa en alcohol, ya que se logró fermentar casi el 100% de la glucosa obtenida en cada una de las seis muestras.
- El análisis de varianza (ANOVA) realizado, se ha desarrollado la prueba de hipótesis, el cual es un procedimiento basado en la evidencia muestral y en la teoría de probabilidad, para determinar si existe o no diferencia significativa entre la cantidad media de glucosa obtenida después de la hidrólisis enzimática en comparación con la obtenida después de la hidrólisis ácida. Para ello se ha desarrollado el procedimiento de cinco pasos sugerido por (Mason & Lind, 1992), el cual consta de los siguientes pasos:
 - 1- Plantear las hipótesis nula y alternativa
 - 2- Seleccionar un nivel de significación
 - 3- Identificar el estadístico de prueba
 - 4- Formular una regla de decisión
 - 5- Tomar una muestra y llegar a una decisión

Luego de definir la hipótesis nula y alternativa se definió que el nivel de significación adecuado para la prueba es de 5% como lo sugiere (Mason & Lind, 1992) ya que el estudio realizado se asemeja a una investigación de

consumo, aunque si bien es cierto este parámetro queda a criterio del investigador. A continuación, se ha definido el estadístico de prueba siendo el mismo la distribución F y la prueba ANOVA lo que permite formular la regla de decisión; como asistente para el desarrollo de los cálculos se ha usado el software estadístico IBM SPSS Statistics en la versión 25. Al final del proceso de prueba de hipótesis se ha establecido que no existe diferencia marcada o relevante entre los niveles de glucosa obtenidos por los dos métodos de hidrólisis aplicados.

Nombre	Tipo	Anchura	Decimales	Etiqueta	Valores	Perdidos	Columnas	Alineación	Medida	Rol
hidrolisis	Numérico	1	0		{1, acida}...	Ninguno	8	Derecha	Nominal	Entrada
glucosa	Numérico	4	2		Ninguno	Ninguno	8	Derecha	Escala	Entrada

Figura 6.1. Vista de variables.

Fuente: Autor, Software SPSS

hidrolisis	glucosa
1	,72
1	2,98
1	5,68
2	,53
2	3,71
2	5,97

Figura 6.2. Vista de datos.

Fuente: Autor, Software SPSS

7 CONCLUSIONES

- La cascarilla de arroz presentó en su composición una humedad del 14%, un contenido de cenizas del 20%, y un tamaño de grano de 1,40mm. Por lo que se puede considerar idónea para el proceso de la obtención de bioetanol. Sin embargo, se requiere disminuir el porcentaje de humedad.

- El mayor rendimiento en azúcares reductores se presenció en la hidrólisis enzimática con un porcentaje de 85% frente a un porcentaje de 70% en la hidrólisis ácida, estos dos procesos a una temperatura de 125°C y un tiempo de retención de 180 minutos. Por lo tanto, se concluye, que estos valores característicos son adecuados para que la hidrólisis enzimática tenga resultados más eficientes que la hidrólisis ácida.
- Para un mejor desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae* se da en una temperatura de 38 °C a 50°C manteniendo un pH entre 4,5-6 por siete días en el biorreactor, suministrando nutrientes como sulfato de amonio.
- La utilización de la celulosa que contiene la cascarilla de arroz es un proceso eficiente para la obtención de alcohol, ya que esta celulosa contiene cantidades significativas de glucosa. Esta glucosa puede ser obtenida mediante una hidrólisis ácida y una hidrólisis enzimática, y esta glucosas se puede fermentar de forma exitosa mediante el empleo de *Saccharomyces cerevisiae* en un biorreactor, dándonos como resultado de este proceso alcohol primario con características muy similares.

8 RECOMENDACIONES

- Es recomendable activar previamente la levadura antes del proceso de fermentación a 30°C por 15 minutos; esto permitirá que la levadura se adapte al medio y el proceso de fermentación sea en menor tiempo.
- Todos los materiales utilizados en el proceso de fermentación deben estar previamente esterilizados para impedir la contaminación de las muestras con otros microorganismos que se pueden encontrar en el ambiente.

- Se aconseja realizar pruebas al alcohol obtenido utilizándolo en un motor y efectuando mediciones de cantidad de CO₂ emitidas a la atmosfera y comparándolo con otro tipo de bio combustible comercial. Esto permitirá conocer si las emisiones generadas por el bioetanol obtenido resultan menos contaminantes que las de los combustibles actuales.
- Se recomienda realizar un análisis sobre la cantidad de bioetanol obtenido por cada gramo de cascarilla de arroz utilizada en la investigación, con el fin de conocer cuanta cascarilla de arroz se debe emplear para obtener cierto volumen de bioetanol.
- Se aconseja realizar un análisis de factibilidad de emplear este proceso de obtención de bioetanol a escala industrial, analizar cuáles son sus ventajas desde el punto de vista económico e industrial. Teniendo en cuenta que el proceso de utilización de acidos y enzimas es costoso pero se está resolviendo un problema de acumulación de residuos de agricultura que causan contaminación al ser tratados de forma incorrecta.

9 BIBLIOGRAFÍA

Abascal Fernández, R., & Garea Vázquez, A. (2017). Estudio de la obtención de bioetanol a partir de diferentes tipos de biomasa lignocelulósica. Matriz de reacciones y optimización, 74.

AGUILAR, J. S. (2009). ALTERNATIVAS DE APROVECHAMIENTO DE LA CASCARILLA DE ARROZ EN COLOMBIA. Retrieved from <https://repositorio.unisucra.edu.co/bitstream/001/211/2/333.794S571.pdf>

Alejos, C., & Calvo, E. (2015). Biocombustibles de primera generación, 18, 19–30.

- Alvarado, L. C. R. (2012). Producción de etanol por fermentación de suero de quesería con levaduras del género *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*, 92. Retrieved from <https://cdigital.uv.mx/handle/123456789/46948>
- Area, M. C., & Vallejos, M. E. (2012). Biorrefinería a partir de residuos lignocelulósicos. Conversión de residuos a productos de alto valor, (April), 191. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Arenas, I., & López, J. L. (2004). Instituto de Biotecnología.
- Aro, E. M. (2016). From first generation biofuels to advanced solar biofuels. *Ambio*, 45, 24–31. <https://doi.org/10.1007/s13280-015-0730-0>
- Baxter, R., Hastings, N., Law, A., & Glass, E. J. . (2008). OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE DESECHOS DE ARROZ. *Animal Genetics*, 39(5), 561–563.
- Behera, S., Ghanty, S., Ahmad, F., Santra, S., & Banerjee, S. (2012). Analytical & Bioanalytical Techniques UV-Visible Spectrophotometric Method Development and Validation of Assay of Paracetamol Tablet Formulation, 3(6). <https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000151>
- Biswas, A. K., Sahoo, J., & Chatli, M. K. (2011). A simple UV-Vis spectrophotometric method for determination of b-carotene content in raw carrot, sweet potato and supplemented chicken meat nuggets. *LWT - Food Science and Technology*, 44(8), 1809–1813. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.03.017>
- Boundy, R. G., Diegel, S. W., Wright, L. L., & Davis, S. C. (2011). Biomass Energy Data Book: Edition 4. <https://doi.org/10.2172/1050890>
- Bradley, M. (2012). FT-IR: Sample Analysis.

- C, L. T., & Paris, E. (2008). Impacto de los tóxicos en el neurodesarrollo, (1), 55–63.
- Castro, M. (2012). Reflexiones en torno al desarrollo de los biocombustibles en Ecuador, 1–6.
- Chávez-Sifontes, M., & Domine, M. E. (2013). Lignin , Structure and Applications : Depolymerization Methods for. *Avances En Ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15–46.
https://doi.org/http://www.exceedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/2013/Vol4/Nro4/3-ACI1184-13-full.pdf
- Chávez, S. A. (2000). Optimización de la Producción del Agene de Biocontrol Candida sake (CPA -1). Retrieved from
<https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8389/TSMAC1de3.pdf?sequence=1>
- Chmielewski, A. G. (2014). ENVIRONMENTAL EFFECTS OF FOSSIL FUEL COMBUSTION, (January 2005).
- Cortez, P. M. (2000). *Espectroscopia de infrarrojo para todos*.
- Cuervo, L., & Folch-mallo, J. L. (2014). Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol ., (October 2014), 16. Retrieved from
<https://www.researchgate.net/publication/266610846>
- Dacosta, H. J. V. y O. (2007). Fermentación alcohólica : Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas., 2007, 249–259.
- Dagnino, E. P., Chamorro, E. R., Felissia, F. E., & Area, M. C. (2014). Obtención de biotanol a partir de la celulosa presente en cascarilla de arroz y aserrín de algarrobo. *XXXVII Reunión de Trabajo de La Asociación Argentina de Energías Renovables y Medio Ambiente*, 2(January), 47–53.

- Darda, S., Papalas, T., & Zabaniotou, A. (2018). Biofuels journey in Europe: currently the way to low carbon economy sustainability is still a challenge. *Journal of Cleaner Production*, 208, 575–588. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.147>
- De Martin, A. M. (2005). *Control del metabolismo de Saccharomyces cerevisiae en la síntesis de glutatión*.
- Dehghani, M., Abadi, M., Ashraf, N., Chamsaz, M., & Shemirani, F. (2012). Talanta An overview of liquid phase microextraction approaches combined with UV – Vis spectrophotometry. *Talanta*, 99, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.027>
- Díaz, N. A., Ruiz, J. A. B., Reyes, E. F., Cejudo, A. G., Novo, J. J., Peinado, J. P., ... Fiñana, I. T. (n.d.). Cuantificación Colorimétrica de Biomoléculas, 1–8.
- Diego, L. D. E. (2014). *EFEECTO DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN ORIGINADOS EN LA EXPLOSIÓN POR VAPOR DE BIOMASA DE CHOPO SOBRE Kluyveromyces marxianus*.
- Eduardo, M. O. H. (2018). Análisis Del Uso De Biocombustibles En Ecuador Periodo 2010-2017, 53.
- Faraldos, M., & Goberna, C. (2011). *Técnicas de Análisis y Caracterización de Materiales*.
- Farid, F., Sideeq, O., Khan, F., & Niaz, K. (2019). *Saccharomyces cerevisiae. Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00066-7>
- FERNANDEZ, J. F. (2018). Poder Calorifico de un Alcohol, 1–22.
- Fernández, J., Lucas, H., Para, L., & Transporte, E. L. (n.d.). Biocarburantes, 20.

Retrieved from <https://www.fenercom.com/pdf/publicaciones/cuadernos-energias-renovables-para-todos-biocarburantes.pdf>

Fleeson, W., Jayawickreme, E., Jones, A. B. A. P., Brown, N. A., Serfass, D. G., Sherman, R. A., ... Matyjek-, M. (2017). “*OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMBUSTIBLE A PARTIR DE DESECHOS TERMOPLÁSTICOS PEBD (LOW DENSITY POLYETHYLENE) RECOLECTADOS EN LA UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL.*” *Journal of Personality and Social Psychology* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2010.02280.x>

Garc, J. M. (n.d.). Biocarburantes líquidos: biodiésel y bioetanol.

Gaviria Acosta, E., Benítez Benítez, R., lenis, L., & Hoyos Concha, jose L. (2015). OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS PRESENTES EN SEMILLAS DE GUANDUL (*Cajanus cajan*). *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(2), 114. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(13\)114-122](https://doi.org/10.18684/BSAA(13)114-122)

Giovannetti, R. (2012). *The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins*. (J. Uddin, Ed.) (Macro To N). INTECH.

Gutiérrez, L. A. U. (2007). Caracterización Fisiológica de Levaduras aislada de la Filósfera de Mora, 154. Retrieved from <https://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis276.pdf>

Hirani, A. H., Javed, N., & Asif, M. (n.d.). A Review on First- and Second-- Generation Biofuel Productions, 141–154.

Houbron, E. (2015). Obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos sometidos a hidrólisis enzimática ”, 89. Retrieved from

<https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/46812/ArellanoPeralesCarla.pdf;jsessionid=9E25B65328C606B365F2F01828E4C66C?sequence=2>

I, C. M. S. D., Juan, P. D., Vidal, A. V., & M, P. D. J. (2017). Influencia de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento y contenido de pared celular en una cepa floculante de *Kluyveromyces marxianus* Influence of the Culture Conditions on the Growth and Cell Wall Content in a Flocculent Strain of *Kluyveromyces ma*, 29(1), 89–102.

IBERDROLA. (2017). Informe de gases de efecto invernadero 2017.

Javier, F., Agenjo, A., & L, T. B. E. S. (2014). NECESIDADES NUTRITIVAS DE LAS LEVADURAS Necesidades nutritivas de las levaduras, 1–9. Retrieved from www.biocor.es

Kalia, V. C., & Saini, A. K. (2017). Metabolic engineering for bioactive compounds: Strategies and processes. *Metabolic Engineering for Bioactive Compounds: Strategies and Processes*, 1–412. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5511-9>

Kang'ethe, E. K., Onono, J. O., McDermott, B., & Arimi, M. (2007). Isolation of *E. Coli* 0157:h7 from milk and cattle faeces from urban dairy farming and non dairy farming neighbour households in Dagoretti Division, Nairobi, Kenya: Prevalence and risk factors. *East African Medical Journal*, 84(11 SUPPL.), 71–87. <https://doi.org/10.1007/978-1-4471-2324-8>

Khattab, S. M. R., & Watanabe, T. (2019). *Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. Bioethanol Production from Food Crops*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813766-6/00010-2>

Kouadri, I., & Satha, H. (2018). Extraction and characterization of cellulose and

- cellulose nanofibers from *Citrullus colocynthis* seeds. *Industrial Crops and Products*, 124(August), 787–796. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.051>
- Leona Paulová, T. B. (2013). Advanced Fermentation Processes, (August).
<https://doi.org/10.1201/b15426-6>
- Limayem, A., & Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production : Current perspectives , potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 449–467.
<https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>
- Linde, A. (2010). Cromatografía de gases.
- Lotfy, H. M., & Hagazy, M. A. (2012). Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy Comparative study of novel spectrophotometric methods manipulating ratio spectra : An application on pharmaceutical ternary mixture of omeprazole , tinidazole and clarithromycin. *SPECTROCHIMICA ACTA PART A: MOLECULAR AND BIOMOLECULAR SPECTROSCOPY*, 96, 259–270.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.04.095>
- Maciel, C. Á. (2009). Mercados Actuales Y Comercio Internacional. *Economía Informa*, 359, 63–89.
- Madrid, V. P. (2015). Estado del desarrollo de biocombustibles en el Ecuador.
- Martín Martín, R., & Sánchez Bayle, M. (2018). Impact of air pollution in paediatric consultations in Primary Health Care: Ecological study. *Anales de Pediatría*, 89(2), 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2017.06.013>
- Mitkidis, G., Magoutas, A., & Kitsios, F. (2017). Market and economic feasibility analysis for the implementation of 2nd generation biofuels in Greece. *Energy*

Strategy Reviews. <https://doi.org/10.1016/j.esr.2017.12.006>

Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10(February), 52–61.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>

Moncayo, F. D. (2016). Validación de los métodos de ensayo de punto de inflamación en cemento, asfalto, gasóleo y jet fuel., (May), 31–48.

Montaño Morales Fabio Héctor. (2014). *Producción de Bioetanol a Partir de Material Lignocelulósico de Moringa Oleífera*.

Morelos Gómez, J. (2016). Análisis de la variación de la eficiencia en la producción de biocombustibles en América Latina. *Estudios Gerenciales*, 32(139), 120–126.
<https://doi.org/10.1016/j.estger.2016.01.001>

Murtaza, G., Khan, S. A., Shabbir, A., Mahmood, A., Hassan, H., Asad, B., ... Hussain, I. (2011). Development of a UV-spectrophotometric method for the simultaneous determination of aspirin and paracetamol in tablets, 6(2), 417–421.
<https://doi.org/10.5897/SRE10.925>

Navarro, E., & Abril, A. (2012). Etanol a partir de biomasa lignocelulósica. *Research Gate*, (October), 101. <https://doi.org/10.1002/glia.22867>

Neira, M. (2010). Fundamentos de espectrofotometría.

Nizama, F. S., Borja, N. A., Rocha, G. G., Infante, A. A., Teixeira, B. J., & Casalino, A. R. (2010). ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPÍA UV Y FTIR DE MACERADOS ACUOSOS Y ALCOHÓLICOS DE Aloe vera L. y Aloe barbadensis Miller. INTERACCIÓN CON SALES INORGÁNICAS.

- Núñez, L., Meas, V., Ortega, B., & Olguin, J. (2004). Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones. *Ciencia. Revista de La Academia Mexicana ...*, 69–83.
- OLAYA QUEREVALÚ, M. T. (n.d.). IDENTIFICACION Y REACCIÓN DE ALCOHOLES. *Guía De Química Orgánica Ii*, (C), 17.
- Olguin Perez, L., & Rodriguez Magadan, H. (2004). *Metodos en Biotecnologia / Cromatografia de gases*. Universidad Nacional Autonoma de Mexico.
- Palmqvist, E. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates . II: inhibitors and mechanisms of inhibition, 74, 25–33.
- Parrales, A., Reyes Vera, M., & Pine Tobar, W. (2012). *CROMATOGRAFIA DEL GAS NATURAL*. Escuela Superior Politecnica del Litoral.
- Piligaev, A. V., Sorokina, K. N., Bryanskaya, A. V., Demidov, E. A., Kukushkin, R. G., Kolchanov, N. A., ... Pel'tek, S. E. (2013). Research on the biodiversity of Western Siberia microalgae for third-generation biofuel production processes. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 3(6), 487–492.
<https://doi.org/10.1134/S2079059713060075>
- Prada, A., & Caroll E. (2010). La Descomposición Térmica De La Cascarilla De Arroz: Una Alternativa De Aprovechamiento Integral. *Orinoquia*, 14(2 sup), 155–170.
<https://doi.org/doi:http://dx.doi.org/10.22579/20112629.103>.
- Qu, H., Zhou, Y., Ma, Y., Zhao, P., Gao, B., & Guo, M. (2018). A green catalyst for hydrolysis of cellulose : Amino acid protic ionic. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, (xxxx), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.09.024>
- Reynoso, L. H., & Montes, A. L. (2016). Impuestos ambientales al Carbono en México y su progresividad: una revisión analítica. *Economía Informa*, 398(2010), 23–39.

<https://doi.org/10.1016/j.ecin.2016.04.003>

Ricardo Suarez. (2017). Microbiología(hongos). Retrieved May 25, 2017, from

<http://tirado031.blogspot.com/2017/05/levaduras.html>

Rodríguez, M. D., Castrillo, M. L., Velázquez, J. E., Kramer, G. R., Sedler, C., Zapata, P. D., & Villalba, L. (2017). Obtención de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino pretratado secuencialmente con ácido-base. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 33(2), 317–324.

<https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.02.12>

Rosa, S. M. de la. (2015). Hidrólisis Ácida De Celulosa Y Biomasa Lignocelulósica Asistida Con Líquidos Iónicos. Retrieved from

<http://digital.csic.es/handle/10261/132717>

Salcedo Mendoza, J., Galán López, J., & Pardo Flórez, L. (2012). Hidrólisis enzimática de residuos de la cosecha de caña de azúcar Hydrolysis Enzymatic of crop residues sugar cane. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIV(1), 171–181.

<https://doi.org/10.1007/BF00006780>

Saranraj, P., Sivasakthivelan, P., & Suganthi, K. (2017). Baker ' s Yeast : Historical Development , Genetic Characteristics , Biochemistry , Fermentation and Downstream Processing, 6(7), 111–119.

Saville, S., & Mason, K. (2008). *Liquid Biofuels. Energy*. Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813056-8.00003-0>

Serrano, T., & Borrachero, M. V. (2012). DISEÑO DE MEZCLAS Y EVALUACIÓN DE PROPIEDADES, 128–136.

Seruga, M., Novak, I., & Jakobek, L. (2011). Food Chemistry Determination of

polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry , HPLC and spectrophotometric methods, 124, 1208–1216.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.047>

Song, K., Ji, Y., Wang, L., Wei, Y., & Yu, Z. (2018). A green and environmental benign method to extract cellulose nanocrystal by ball mill assisted solid acid hydrolysis. *Journal of Cleaner Production*.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.06.128>

Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, 2, 29–47.

Suárez-machín, C., Garrido-carralero, N. A., & Guevara-rodríguez, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol . Revisión bibliográfica, 10. Retrieved from
<https://www.redalyc.org/pdf/2231/223148420004.pdf>

Thuvander, J., & Jönsson, A. S. (2019). Influence of air and nitrogen sparging on flux during ultrafiltration of hemicelluloses extracted from wheat bran. *Separation and Purification Technology*, 212, 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.11.010>

Tierny, J., Vandeborre, J., & Daoudi, M. (2008). *Bioetanol de Caña de Azúcar-Energía para el Desarrollo Sostenible. The Visual Computer* (Primera Ed, Vol. 24). Rio de Janeiro. Retrieved from
[http://www.olade.org/sites/default/files/CIDA/Biocomustibles/CEPAL/bioetanol caña de azucar.pdf](http://www.olade.org/sites/default/files/CIDA/Biocomustibles/CEPAL/bioetanol%20ca%C3%B1a%20de%20az%C3%BAcar.pdf)

Tipanluisa, L., Moreno, G., & Celi, S. (2015). Estudio experimental de la combustión de la cascarilla de arroz en una cámara de lecho fijo, (March).

- Türker, M. (2015). Yeast Biotechnology : Diversity and Applications Yeast Biotechnology : Diversity and Applications, (April 2014). Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/285598626_Yeast_Biotechnology_Diversity_and_Applications
- Urquiza, J., & Acero, H. (n.d.). Reemplazar el uso de diésel por cascarilla de arroz empleado para generación de vapor. Aspectos técnicos y económicos. *Revista Tecnológica ESPOL*, xx. Retrieved from https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/19195/1/resumen_cascarilla_de_arroz.pdf
- Vargas, J., Alvarado, P., Vega Baudrit, J., & Porras, M. (2013). Caracterización del subproducto cascarilla de arroz en búsqueda de posibles aplicaciones como materia prima en procesos. *Revista Científica*, 23(1), 87–102.
- Vega, E. Z. (n.d.). Producción de Alimentos por Actividad Bacteriana – Fermentación, 1–12. <https://doi.org/10.1108/17511340810893090>
- VILLALOBOS, V. A. C. (2010). COMPARACIÓN DE PRETRATAMIENTOS EN RESIDUOS FORESTALES PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN: HIDRÓLISIS ÁCIDA Y LÍQUIDOS IÓNICOS. *Victoria*.
- Virgínio e Silva, J. O., Almeida, M. F., da Conceição Alvim-Ferraz, M., & Dias, J. M. (2018). Integrated production of biodiesel and bioethanol from sweet potato. *Renewable Energy*, 124, 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.07.052>
- Wyman, C., Decker, S., Himmel, M., Brady, J., Skopec, C., & Viikari, L. (2004). *Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose. Polysaccharides*. <https://doi.org/10.1201/9781420030822.ch43>

Zamora-hernández, T., Prado-fuentes, A., Capataz-tafor, J., & Peña-castro, B. E. B. J.

M. (2014). Demostraciones prácticas de los retos y oportunidades de la producción de bioetanol de primera y segunda generación a partir de cultivos tropicales.

Educación Química, 25(2), 122–127. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(14\)70534-8](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(14)70534-8)

Zavaleta-Mejía, E., & Lagunes-Fortíz, E. (2015). Función de la Lignina en la

Interacción Planta-Nematodos Endoparásitos Sedentarios. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 43–63.

<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1506-7>

10 ANEXOS

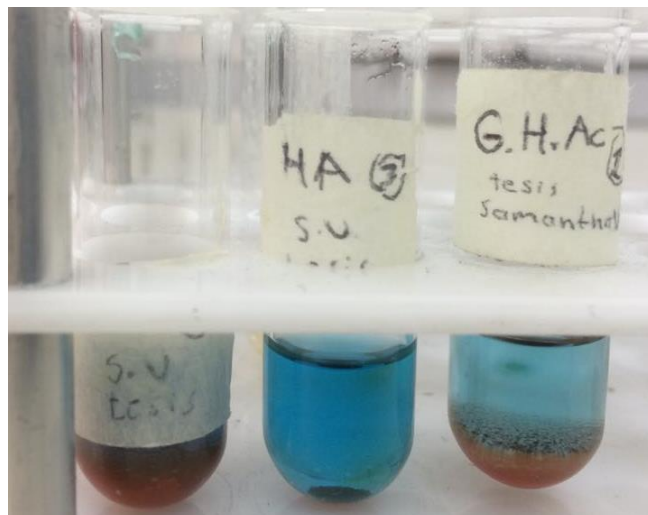


Figura 10.1. Anexo 1, pruebas de Fehling A y Fehling B.

Fuente: Autor

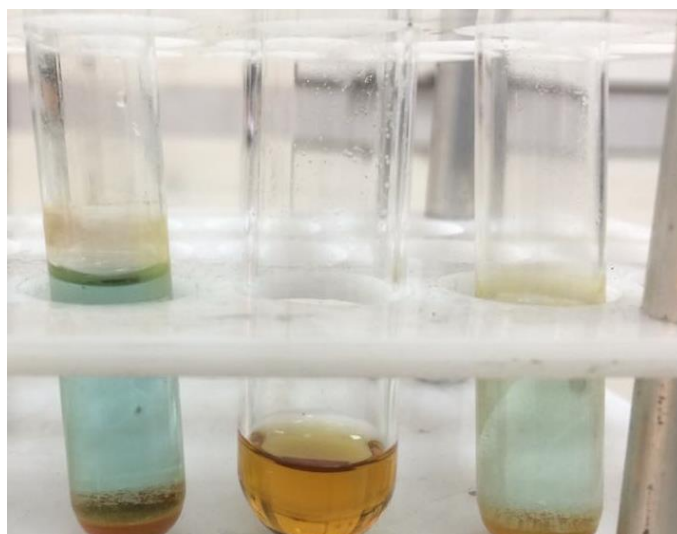


Figura 10.2. Anexo 2, pruebas de Fehling A y Fehling B.

Fuente: Autor