

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
DE LOS RECURSOS NATURALES**

*Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Ingeniera en
Biotecnología de los Recursos Naturales*

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**“DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE
FERMENTACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DEL
HIDROLIZADO ÁCIDO DE LA CORTEZA DEL CACAO (*Theobroma cacao*)
PROVENIENTE DE LA INDUSTRIA CACAOTERA DEL ECUADOR”**

AUTORA:

KELLY NOEMY LOAYZA CALVA

TUTOR:

PABLO WILSON ARÉVALO MOSCOSO, PhD

CUENCA - ECUADOR

2020

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Kelly Noemy Loayza Calva con documento de identificación N° 0704928928, 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: **“DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE FERMENTACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DEL HIDROLIZADO ÁCIDO DE LA CORTEZA DEL CACAO (*Theobroma cacao*) PROVENIENTE DE LA INDUSTRIA CACAOTERA DEL ECUADOR”**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En la aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora me reservo de los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato digital a la biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, febrero del 2020



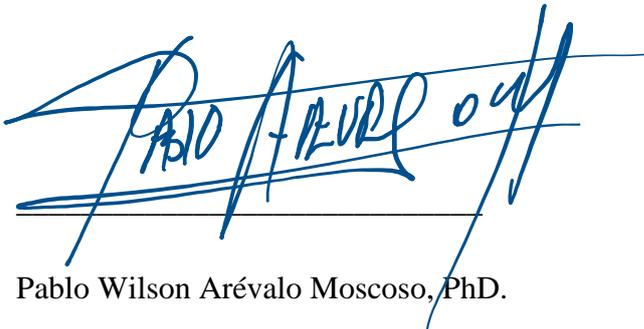
Kelly Noemy Loayza Calva

C.I. 0704928928

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación:
“DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE FERMENTACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DEL HIDROLIZADO ÁCIDO DE LA CORTEZA DEL CACAO (*Theobroma cacao*) PROVENIENTE DE LA INDUSTRIA CACAOTERA DEL ECUADOR”,
realizado por Kelly Noemy Loayza Calva, obteniendo el *Trabajo Experimental*, que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, febrero del 2020



Pablo Wilson Arévalo Moscoso, PhD.

C.I. 0102156957

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Kelly Noemy Loayza Calva con documento de identificación N° 0704928928, autora del trabajo de titulación: **“DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE FERMENTACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DEL HIDROLIZADO ÁCIDO DE LA CORTEZA DEL CACAO (*Theobroma cacao*) PROVENIENTE DE LA INDUSTRIA CACAOTERA DEL ECUADOR”**, certifico que el total contenido del *Trabajo Experimental* es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, febrero del 2020



Kelly Noemy Loayza Calva

C.I. 0704928928

DEDICATORIA

Dedico esta tesis de manera especial a mis queridos padres Arturo y Narcisa, por su constante apoyo, por los sabios consejos y cariño ilimitado que me supieron dar.

A mis hermanas y hermanos por ser fuente de superación.

A mi familia en general por haber depositado en mí la confianza de verme realizada como profesional, por sus palabras de aliento y cariño. No menos importante a Dios por guiar mí camino, por sostenerme en días difíciles hasta haber alcanzado esta importante meta.

AGRADECIMIENTO

Agradezco infinitamente a Dios por acompañar y guiar cada paso dado en esta trayectoria, por poner en mi camino a las personas indicadas para atravesarla, y por haberme dado fortaleza para lograr mi objetivo lejos de mis seres queridos.

Con todo el amor agradezco de manera especial a mis queridos padres Arturo y Narcisa por ser pieza clave para que yo lograra esta meta, por todo el sacrificio realizado, por despedirme cada vez que viajaba con el más sincero amor y así mismo recibirme cada vez que retornaba a casa con los brazos abiertos. Fueron muchas las palabras de aliento y consejos que quedan plasmados en mi mente y que me motivaron a seguir adelante en cada año de mi carrera universitaria. No existen palabras suficientes para expresar toda mi gratitud hacia ellos.

Agradezco a mis familiares en general porque siempre me alentaron a alcanzar mis sueños, en especial a mi tío Vicente y tía Dina, ya que sus bondadosos corazones hicieron posible todo esto.

A mi tutor de tesis Ing. Pablo Arévalo que con su sabiduría y esfuerzo me supo guiar durante este importante proyecto de investigación. Al resto de docentes en especial a la Dra. Inés, gracias por todos los conocimientos impartidos y demostrar la importancia de la carrera de Biotecnología.

Todas las personas que contribuyeron para que alcanzara mi formación profesional, muchas gracias.

SIGLAS Y ACRÓNIMOS

CSG: Combustibles de segunda generación

CTA: Centro Tecnológico de la Aeronáutica

DP: Grado de polimerización

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

GC-MS: Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas

GEI: Gases de Efecto Invernadero

HCl: Ácido clorhídrico

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

NaOH: Hidróxido de sodio

FDA: Fibra detergente ácido

FDN: Fibra detergente neutro

MSR: Método de Superficie de Respuesta

PIB: Producto Interior Bruto

RESUMEN

En el Ecuador, la cáscara de cacao es un residuo abundante subutilizado. Su composición lignocelulósica le confiere la capacidad de ser procesado y transformado a etanol. La presente investigación, realizó los respectivos análisis bromatológicos, con la finalidad de conocer su composición lignocelulósica y determinar la capacidad de transformación. El análisis demostró que la cáscara de cacao está compuesta de 29.07% celulosa, 2.97% hemicelulosa, y 33.90% lignina. Debido al alto contenido de lignina se efectuó primero un pre-tratamiento alcalino (NaOH) combinado con explosión por vapor (autoclavado), y procedido por un segundo tratamiento de ácido diluido. Una vez degradada la lignina y liberada la celulosa se aplicó una hidrólisis con ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 50% para liberar los azúcares reductores presentes en el material pre-tratado. La fermentación se optimizó mediante un diseño central compuesto usando la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM). El diseño indicó realizar 15 corridas base con 2 repeticiones, en el cual los factores a emplear fueron pH (3-6), tiempo (3-7 días) y temperatura (25 °C-35 °C). La fermentación alcohólica se efectuó con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Después de cumplir con las condiciones de fermentación las muestras se destilaron y analizaron mediante cromatografía de gases (CG). La maximización de respuesta se alcanzó con las siguientes condiciones óptimas: pH de 4.5, 3 días de fermentación y a 25 °C. La concentración de etanol fue de 0.41 mg/L, mismo valor logrado al replicar las variables óptimas en un biorreactor con un volumen de 2 L.

Palabras clave: Lignocelulosa, hidrólisis, fermentación, RSM, bioetanol, biorreactor.

ABSTRACT

In Ecuador, cocoa husk is an abundant underutilized residue. Its lignocellulosic composition gives it the ability to be processed and transformed into ethanol. The present investigation, carried out the respective bromatological analyzes, with the purpose of knowing its lignocellulosic composition and determining the capacity of transformation. The analysis showed that the cocoa shell is composed of 29.07% cellulose, 2.97% hemicellulose, and 33.90% lignin. Due to the high lignin content, an alkaline pre-treatment (NaOH) combined with steam explosion (autoclaving) was first performed, and proceeded by a second dilute acid treatment. After degrading the lignin and releasing the cellulose, a hydrolysis with 50% sulfuric acid (H₂SO₄) was applied to release the reducing sugars present in the pre-treated material. The fermentation was optimized by a central composite design using the response surface methodology (MSR). The design indicated 15 base runs with 2 repetitions, in which the factors to be used were pH (3-6), time (3-7 days) and temperature (25 °C-35 °C). Alcoholic fermentation was carried out with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. After fulfilling the fermentation conditions the samples were distilled and analyzed by gas chromatography (GC). The maximization of response was achieved with the following optimal conditions: pH of 4.5, 3 days of fermentation and at 25 °C. The ethanol concentration was 0.41 mg / L, the same value achieved by replicating the optimal variables in a biorreactor with a volume of 2 L.

Keywords: lignocellulose, hydrolysis, fermentation, RSM, bioethanol, bioreactor.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema	4
1.3 Pregunta de investigación	5
1.4 Delimitación del problema	5
1.5 Justificación.....	6
1.6 Objetivos	8
1.6.1 Objetivo general	8
1.6.2 Objetivos específicos	8
1.7 Hipótesis.....	8
1.8 Variables	8
1.8.1 Variables Dependientes.....	8
1.8.2 Variables Independientes	9
1.8.3 Variables Intervenientes.....	9
CAPÍTULO 2	10
2. MARCO TEÓRICO	10
2.1. Marco conceptual	10
2.2 Marco de referencia.....	11
2.3 Fundamentos teóricos.....	14
2.3.1 Combustible	14

2.3.2 Biocombustible	15
2.3.3 Etanol	16
2.3.3.1 Propiedades del etanol.....	18
2.3.3.2 Etanol de primera generación.....	18
2.3.3.3 Etanol de segunda generación	19
2.3.3.4 Etanol de tercera generación	20
2.3.3.5 Etanol de cuarta generación	20
2.3.3.6 Aplicaciones actuales del etanol	20
2.3.3.7 Situación internacional del etanol	21
2.3.3.8 Situación nacional del etanol.....	22
2.3.4 Biomasa	23
2.3.4.1 Biomasa lignocelulósica.....	24
2.3.4.2 Celulosa.....	25
2.3.4.3 Hemicelulosa.....	26
2.3.4.4 Lignina	27
2.3.5 Materiales Lignocelulósicos.....	28
2.3.6 Cacao.....	29
2.3.6.1 Cultivo de cacao en el Ecuador	31
2.3.6.2 Composición química del cacao.....	31
2.3.6.3 Residuos de la industria cacaotera	33
2.3.6.4 Cáscara de cacao como materia prima energética.....	33
2.3.7 Tratamientos para la obtención de etanol.....	35
2.3.8. Pre-tratamiento	35

2.3.9 Técnicas de hidrólisis y fermentación.....	37
2.3.9.1 Hidrólisis y fermentación separadas (SHF)	37
2.3.9.2 Sacarificación y fermentación simultaneas (SSF).....	38
2.3.10 Hidrólisis.....	38
2.3.11 Fermentación.....	40
2.3.11.1 Fermentación alcohólica	40
2.3.11.2 Microorganismos empleados en la fermentación.....	41
2.3.12 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
2.3.12.1 Morfología.....	42
2.2.12.2 Metabolismo	42
2.2.12.3 Factores para el crecimiento y desarrollo de la levadura	42
CAPÍTULO 3	44
3. MARCO METODOLÓGICO	44
3.1 Nivel y diseño de investigación	44
3.1.1 Población y muestra	44
3.1.2 Variables	45
3.1.2.1 Independientes.....	45
3.1.2.2 Dependiente.....	45
3.1.2.3 Intervinientes	46
3.2 Técnicas empleadas.....	46
3.2.1 Técnicas e instrumentos para la recolección de datos.....	46
3.2.2 Técnicas de análisis y procesamiento de datos	46
3.4 Procedimientos	47

3.4.1 Acondicionamiento de la muestra	47
3.4.1.1 Recolección de la muestra.....	47
3.4.1.2 Reducción de tamaño	47
3.4.1.3 Secado	48
3.4.1.4 Disminución del tamaño	49
3.4.1.5 Tamizado	50
3.4.2 Caracterización química de la cáscara	50
3.4.3 Tratamientos.....	51
3.4.3.1 Pre-tratamiento alcalino	51
3.4.3.2 Tratamiento ácido.....	52
3.4.3.3 Hidrólisis ácida.....	52
3.4.3.4 Prueba de Fehling A y Fehling B	54
3.4.3.5 Fermentación alcohólica	55
3.4.3.6 Fermentación en biorreactor.....	56
3.4.3.7 Destilación simple por arrastre de vapor.....	57
3.4.4 Análisis Químico.....	58
CAPÍTULO 4	61
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
4.1 Caracterización química de cáscara de cacao (<i>Theobroma cacao</i>).....	61
4.2 Hidrólisis ácida.....	62
4.3 Efectos de las variables independientes (Ph, temperatura y tiempo) en la obtención de etanol	63
4.4. Análisis de la varianza (ANOVA) y pruebas de significancia estadística ...	65

CAPÍTULO 5	76
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	76
5.1 Conclusiones	76
5.2. Recomendaciones.....	77
BIBLIOGRAFÍA.....	78
ANEXOS.....	89
Anexo 1. Resultados de análisis bromatológico de la cáscara de cacao.....	89
Anexo 2. Resultados de azúcares reductores en cada muestra (Fehling A y Fehling B).....	90
Anexo 3. Cromatograma: curva de calibración.....	91
Anexo 4. Cromatograma: Muestra optimizada (azul), muestra biorrecator (Fucsia).	92
Anexo 5. Promedio de los resultados de fermentación.	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades del etanol	18
Tabla 2. Materiales lignocelulósicos y sus principales componentes	29
Tabla 3. Composición química de la cáscara externa del fruto del cacao	32
Tabla 4. Composición química del grano de cacao	32
Tabla 5. Composición química del mucilago del cacao.....	33
Tabla 6. Balance energético y ambiental de cultivos para la producción de etanol y biodiesel	34
Tabla 7. Factores considerados, modelo Box Behnken.	60
Tabla 8. Corridas base, diseño Box Behnken.	60
Tabla 9. Composición química de la cáscara de cacao.....	61
Tabla 10. Concentración de H ₂ SO ₄ en el hidrolizado y °Bx correspondientes.	62
Tabla 11. Prueba de ajuste en los modelos disponibles	66
Tabla 12. Prueba de ajuste modificada en los modelos disponibles	66
Tabla 13. ANOVA para la producción de etanol.....	67
Tabla 14. Ecuación de regresión en unidades no codificadas	73

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Fórmula química del etanol	16
Ilustración 2. Consumo de derivados del sector automotriz, subsidios de gasolinas y precio del etanol en el Ecuador.	22
Ilustración 3. Materia lignocelulósica y sus tres polímeros (Celulosa, hemicelulosa y lignina).	25
Ilustración 4. Fórmula química del polímero de la celulosa	26
Ilustración 5. Fórmula química de la hemicelulosa	27
Ilustración 6. Fórmula química de la lignina.	28
Ilustración 7. Fruto Theobroma cacao L.	30
Ilustración 8. Estructura química: hidrólisis de materiales lignocelulósicos	39
Ilustración 9. Trituración mecánica de las cáscaras de cacao	48
Ilustración 10. Proceso de secado de la cáscara de cacao	49
Ilustración 11. Molinos empleados para la disminución de partícula de la cáscara. ...	50
Ilustración 12. Pre-tratamiento alcalino	51
Ilustración 13. Material posterior al tratamiento ácido	52
Ilustración 14. Hidrólisis ácida	53
Ilustración 15. Prueba de Fehling positiva	54
Ilustración 16. Prueba cuantitativa de azúcares reductores, método Fehling.	55
Ilustración 17. Activación de Saccharomyces cerevisae	56
Ilustración 18. Fermentación en biorreactor LAMBDA MINIFOR	57
Ilustración 19. Destilación del fermentado	58
Ilustración 20. Cromatógrafo de Gases, Thermo Scientific	59

Ilustración 21. °Bx del hidrolizado al 50% de H ₂ SO ₄	63
Ilustración 22. Test de Anderson-Darling obtenido del programa Minitab® 18.	64
Ilustración 23. Gráfica de residuos vs. orden.	65
Ilustración 24. Diagrama de Pareto: pH (A), temperatura (B), tiempo (C)	68
Ilustración 25. Gráfica normal de efectos estandarizados.....	69
Ilustración 26. Gráfica de efectos normales absolutos estadarizados.	70
Ilustración 27. Gráfica de efectos principales: pH, (t) temperatura, tiempo..	71
Ilustración 28. Interacciones de las variables en el diseño central compuesto.	73
Ilustración 29. Gráfica de optimización de las variables dependientes obtenida de Minitab®: pH, tiempo, y temperatura (t).	74
Ilustración 30. Gráfica de Superficie de Respuesta del rendimiento de etanol vs. pH y temperatura.....	75

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La necesidad de optimizar el uso de recursos naturales no renovables siempre conlleva a la búsqueda y creación de opciones o productos para suplantar una cosa con otra. Tal es el caso de los biocombustibles, cuya invención surgió con la idea de reemplazar a los combustibles fósiles por aquellos de origen renovable.

El nacimiento de los biocombustibles se dio a fines del siglo XIX, con la producción e implementación de aceites vegetales en motores de combustión interna. En 1895 el Dr. Rudolf Diésel creó un motor con el que se realizaron pruebas exitosas utilizando aceite de maní, logrando comprobar la efectividad de los aceites vegetales como combustible (Salinas & Gasca, 2009).

En 1908, el empresario innovador Henry Ford, usó etanol en su automóvil modelo Ford T, despertando así el interés de los productores de combustibles. A raíz de esto, se construyó una planta en Kansas de biocombustible a partir de maíz (Calderón, 2016). Se producían 38 000 litros diarios de etanol destinados a la automoción, cerca de 2000 estaciones de servicio en el Medio Oeste expendían este combustible alternativo denominado “Gasol”. Para los años 40, la planta de producción no podía competir frente al bajo precio del petróleo lo que provocó su cierre (Peláes & Palma, 2011).

Otras empresas, como Standard Oil incursionaron en el mundo del combustible alternativo en el área de Baltimore, Estados Unidos. Incorporaron 25% de etanol a la gasolina, y una vez más este proyecto no se mantuvo por mucho tiempo debido al alto

costo del maíz y de su almacenamiento junto con su complicado transporte (Salinas & Gasca, 2009).

Los biocombustibles volvieron a ser punto de interés en el mercado, como consecuencia de la primera crisis de petróleo ocurrida en 1973. El precio del petróleo se elevó excesivamente afectando a todos los países, en especial aquellos que no contaban con reservas petrolíferas. A finales de los setenta, se estableció una mezcla de gasolina y etanol, como respuesta al elevado precio del petróleo y el agotamiento del mismo. Brasil, siendo uno de los países afectados empezó a producir biocombustible a partir de caña de azúcar, y Estados Unidos a partir del maíz (C. Álvarez, 2009). Brasil, mayormente afectado ante la crisis de los precios de petróleo, emprendió el programa Proalcohol, con el fin de crear motores con función a base de alcohol y de establecer matrices de energía alternativas que conllevaran a sustituir al petróleo. El motor fue procesado por el Centro Tecnológico de la Aeronáutica (CTA), y el etanol elaborado a partir de la caña de azúcar. El proyecto resultó ser rentable durante la crisis, gracias al alto precio del petróleo y el bajo precio del azúcar, convirtiéndolo en un éxito. Para el año 1986, el 96% de los automóviles manufacturados en Brasil funcionaban con motor en función de alcohol. A final de los 80, la repentina caída de precios del petróleo y el alza del azúcar llevaron al proyecto a la ruina, ya que para 1995, apenas el 3% de los automóviles eran fabricados con motor de alcohol (Daniel *et al.*, 2012).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO), indica que a pesar de los altos y bajos que se han presentado a través de los años, los biocombustibles se han mantenido como una alternativa al combustible común. La primera década del 2000 resultó ser beneficioso para la industria, ya que a partir de esos

años los mercados mundiales de biocombustibles se comenzaron a recibir respaldo de políticas públicas que impulsan su producción e implementación. El soporte gubernamental hacia los biocombustibles, se ve reflejado en: las normativas obligatorias de mezclas, las exenciones fiscales presentes en los combustibles carburantes y el apoyo a la inversión. Así como existen aspectos beneficiosos, también se hacen presente las limitaciones en el mercado ante políticas que imponen criterios de sostenibilidad, estándares de calidad y aranceles de importación (OCDE/FAO, 2017).

Actualmente, Ecuador se ha sumado a aquellos países que producen su propio combustible con alternativa denominado Ecopaís. Dicho combustible está compuesto por 95% de gasolina extra, 5% de etanol anhidro y mantiene el nivel de 80 octanos. Al analizar esta innovación se puede constatar que la producción de este combustible sigue dependiendo en gran parte de derivados de petróleo (Líderes, 2015).

El etanol producido para complementar la gasolina Ecopaís es extraído a partir de materia prima de la caña de azúcar, para esto se destinaron al menos 80 000 hectáreas de sembrío, reduciendo el potencial del suelo para la alimentación de la población ecuatoriana. Es por esta razón que se deben buscar fuentes alternas a partir del aprovechamiento de residuos agroindustriales existentes. Estos residuos pueden, ser transformados en etanol con el objetivo de suplir la demanda nacional anual que bordea los 900 millones. Con esta cantidad es posible generar un combustible Ecopaís con una composición del 15% de etanol para el 2020 (El telégrafo, 2013).

1.2 Planteamiento del problema

El mundo actual es dependiente del petróleo para desenvolverse en su día a día, más del 80% del consumo total de energía proviene de los combustibles fósiles (Y. J. Torres, 2016)

Es sabido que el petróleo es una fuente de energía no renovable y se estima que quedarían 1.707 billones de barriles, lo que da para seguir explotándolo 50.6 años más. Con el tiempo la dependencia del petróleo y sus consecuencias dañinas al medio ambiente han hecho que se fortalezca la relación entre desarrollo, energía y entorno. Los nuevos desafíos para la sostenibilidad plantean soluciones se encuentran en los escenarios locales de gestión energética, tanto en los países en desarrollo como en los industrializados.

Los cultivos agrícolas generan gran cantidad de residuos que mediante una buena gestión se pueden aprovechar para crear subproductos que sean beneficiosos para la población. Una de las principales actividades económicas en el Ecuador es la agricultura, entre los sembríos más importantes está: el banano, cacao, café, caña de azúcar, etc. Es importante estudiar y aprovechar la biomasa residual, para procesar dichos residuos y transformarlos en etanol, con la finalidad de producir biocombustible.

La industria del cacao en el Ecuador tiene como destino principal la elaboración de chocolate y sus derivados, estos productos se extraen específicamente de la semilla, que viene representando a penas el 10% del peso del fruto seco. El resto de la fruta, incluyendo la película, cáscara y demás es desechado y en el mejor de los casos aprovechado como abono orgánico. Este hecho se ha traducido en problemas ambientales ya que ocupan una alta dispersión espacial. La cáscara, al ser un material

grueso, tiene un proceso de degradación lento generando problemas sanitarios, paisajísticos y, más importante, un desperdicio de materia potencial para la obtención de bioetanol (Loyo, 2015).

Aunque son numerosos los proyectos realizados con la finalidad de obtener etanol a partir de distinta materia y biomasa lignocelulósica, vale recalcar que son pocos los estudios basados en el aprovechamiento de la cáscara del cacao. En este contexto, se enfatiza en la importancia de la investigación y experimentación de dicho residuo. Con la presente investigación se busca determinar las condiciones óptimas de fermentación (pH, temperatura, tiempo de fermentación), y mediante un pre-tratamiento alcalino e hidrólisis ácida obtener un mayor rendimiento de bioetanol.

1.3 Pregunta de investigación

¿Cuáles son las condiciones óptimas del proceso de fermentación para obtener un mayor rendimiento de etanol?

1.4 Delimitación del problema

El siguiente trabajo de investigación sobre la determinación de las condiciones óptimas para la obtención de bioetanol a partir de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao*), se desarrolló en los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca. Desde el comienzo se estableció concluir la investigación dentro de un lapso de seis meses, tomando en cuenta posibles limitaciones en cuanto a tiempo, obtención de materia prima (en función de la época de cosecha de la fruta), disponibilidad de material y equipos de laboratorio. En cuanto a bibliografía, vale recalcar que son escasos los estudios realizados en los que se emplea la cáscara de cacao como materia prima para la obtención de etanol, por lo que el proceso llevado a

cabo en la presente investigación experimental es el resultado de la fusión de distintos procesos empleados a otros materiales, entre ellos la cáscara de coco.

1.5 Justificación

Las limitadas reservas petrolíferas y la necesidad de frenar la contaminación causada por la quema de combustibles fósiles, han avivado la búsqueda de fuentes alternativas para la producción de combustibles. La base para la producción de estos combustibles alternativos es el bioetanol, cuya materia prima, debe ofrecer un balance entre el beneficio económico sin amenazar la soberanía alimentaria de la población mundial.

En la actualidad, la energía primaria proviene en un 80% del petróleo, carbón y gas natural. Se estima que para el año 2030, aquella proveniente de fuentes renovables siga representando una mínima parte. No es de desconocimiento que el sector de transporte depende casi en su totalidad de combustibles derivados del petróleo, con un incremento anual del 1.4%. Si se continúa con la extracción excesiva, se prevé que para mediados de este siglo las reservas petrolíferas lleguen a agotarse (Castro, Beltrán, & Ortiz, 2012).

Los Gases de Efecto Invernadero (GEI), cada vez incrementan más como consecuencia de la actividad humana, en especial por las emisiones de CO₂, que están causando el denominado “Cambio Climático”. Parte de la solución está en la reducción del consumo de derivados de petróleo (Lenin & Oscullo, 2016). El sector de transporte exige una alta demanda de combustibles, consume un 30% de energía utilizada a nivel mundial. En el presente, se consumen aproximadamente 83.7 millones de barriles de petróleo y se llega a estimar que para el año 2020 estas cifras aumenten a 112 millones de barriles diarios (Rico, 2009)

La razón por la que se debe suplantar al petróleo por bioetanol está en la disminución de emisión de CO₂ en el ambiente. Por cada kilogramo de petróleo se libera 7.14 kg de CO₂ mientras que por cada kilogramo de etanol se libera 0.956 kg de CO₂. Es decir, el petróleo emite siete veces más GEI en comparación con el etanol (Mosquera, Fernandez, & Mosquera, 2010). Con estas cifras es evidente que el etanol tiene un impacto ambiental favorable en comparación con la quema de combustibles fósiles, siendo no solo mejor para la salud sino para aplacar el efecto invernadero que se vive y atemoriza al mundo entero (Delius, 2008).

El etanol agrícola, se obtiene a partir de materia prima no-fósil. Este tipo de etanol puede provenir de distintas fuentes y según su origen ser clasificado en; etanol de primera, segunda o tercera generación. El de primera generación proviene de cultivos agrícolas que pueden ser aprovechados para la alimentación humana. Los de segunda generación se obtienen a partir de biomasa lignocelulósica. Este material es rescatado de productos resultantes, llegando a ser una alternativa renovable, que al ser procesada puede utilizarse en vehículos (Mercedes Ballesteros, 2008). El etanol de tercera generación, se extrae de biomasa no alimenticia, como ejemplo, las algas. En el presente trabajo de investigación, se recomienda el aprovechamiento de residuos generados en la actividad agrícola del país. El cultivo de cacao, cuenta con una gran extensión y tan solo el 10% del peso del fruto fresco es aprovechado, por lo que se ha tomado la cáscara de cacao como materia prima para la obtención de bioetanol (Abarca, Martínez, Muñoz, Torres, & Vargas, 2010).

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Determinar las condiciones óptimas del proceso de fermentación a partir del hidrolizado ácido de la cáscara del cacao (*Theobroma cacao L*), para la obtención de un buen rendimiento en el proceso de etanol.

1.6.2 Objetivos específicos

- Determinar la composición de la biomasa de la cáscara del cacao (*Theobroma cacao L*) mediante análisis bromatológicos para la caracterización de su composición lignocelulósica.
- Evaluar las condiciones óptimas en el proceso de fermentación (pH, temperatura, y tiempo de fermentación) a partir del hidrolizado ácido de la cáscara del cacao (*Theobroma cacao L*), mediante pruebas de laboratorio para la identificación de los parámetros que aporten un mayor rendimiento de bioetanol.
- Establecer el modelo estadístico más apropiado para la optimización a través de pruebas estadísticas (diseño de superficie de respuesta) estableciendo las condiciones óptimas.

1.7 Hipótesis

El rendimiento de bioetanol depende de los factores del proceso de fermentación a partir del hidrolizado ácido.

1.8 Variables

1.8.1 Variables Dependientes

Rendimiento de bioetanol

1.8.2 Variables Independientes

- Temperatura
- pH
- Tiempo de fermentación

1.8.3 Variables Intervinientes

- Tamaño de partícula
- Contenido de lignocelulosa presente en la cáscara de cacao

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Marco conceptual

La organización internacional National Geographic Society, indica que los biocombustibles tienen una existencia igual de larga a los automóviles. Estos fueron creados al principio del siglo XX, e implementados por Henry Ford para sus populares Modelos T, que funcionaban inicialmente con etanol. Durante años los biocombustibles se vieron opacados por grandes depósitos petrolíferos, que hacían de la gasolina y petróleo una mejor opción debido a sus bajos costos. En los últimos años el alza de precios y la conciencia ambiental han hecho que estos combustibles de alternativa renovable vuelvan a crear interés (National Geographic, 2010).

La presente investigación, se basa en la obtención de etanol de segunda generación, mediante el aprovechamiento de aquellos residuos provenientes de la agroindustria en el Ecuador. Siendo la industria cacaotera unas de las más grandes a nivel nacional y por ende fuente de gran cantidad de desperdicio lignocelulósico. Se escogió a la cáscara de cacao con la finalidad de crear un combustible alternativo renovable conocido como “biocombustible”.

Una de las razones para emplear específicamente la cáscara de cacao en este trabajo de investigación, es la poca importancia que se le ha dado hasta el momento. Existe un sinnúmero de proyectos en los que se emplea la cáscara del banano, arroz, naranja, bagazo de caña, etc., pero muy pocos que busquen aprovechar los residuos de la agroindustria del cacao. Debido a la creciente demanda por los biocombustibles, es importante explorar nuevas materias primas de donde extraer y sobre todo aprovechar

los residuos que se generan en los procesos productivos de los sectores agrícolas ya que estos no compiten con la producción de alimentos.

La biomasa que se emplea, atraviesa distintos procesos indispensables para su conversión a etanol. Estos procesos comprenden en general cuatro etapas principales: pre-tratamiento mecánico (reducción de tamaño del material), tratamiento, hidrólisis y, finalmente, la fermentación. Para cada una de estas etapas existen varias técnicas con las que se puede proceder y estas deben seleccionarse tomando en cuenta factores clave, con la finalidad de obtener los más altos rendimientos.

La biomasa lignocelulósica de origen vegetal, como lo es la cáscara de cacao está formada principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina. Esta estructura celular tiene la función de brindarle rigidez al vegetal, el reto está en degradar la lignina y romper la celulosa, para transformarlas en glucosa y otros azúcares durante las etapas de tratamiento e hidrólisis. Los azúcares obtenidos luego son convertidos en etanol mediante la fermentación con levadura.

Para que los biocombustibles de origen agrícola sean rentables, se debe lograr que el conjunto de procesos de conversión alcancen balances energéticos positivos, y que su coste de producción sea lo más bajo posible para que pueda competir en el mercado con aquellos combustibles derivados del petróleo.

2.2 Marco de referencia

Los biocombustibles no son un tema nuevo, pero si se ha expandido la investigación en relación a la biomasa, tratamientos y tecnología que se emplea para la obtención del mismo. Por esta razón, ha sido de suma importancia basarse en varios proyectos similares al presente con la finalidad de analizar los distintos procesos. Creando así un

procedimiento fusionado que se acople a las condiciones de la cáscara de cacao, tecnología y materiales disponibles. A continuación, se hace referencia a los trabajos que destacaron y de los cuales se ha extraído información valiosa para esta investigación.

Una de las investigaciones que se tomó en cuenta para este estudio es la de Awolu O. y Oyeyemi S., (2015). Los autores realizaron una optimización de las condiciones para la obtención de bioetanol utilizando la cascarilla de cacao como materia prima. La hidrólisis se realizó con ácido sulfúrico (H_2SO_4) en concentraciones de 0.5 a 5.0 mol/dm³, mientras que para la fermentación se utilizó levadura *Sacchamoryces cerevisae* en concentraciones de 0.01 a 0.05 mg/L y pH de 4.5 a 7. Como resultado obtuvieron que las condiciones óptimas de hidrólisis con H_2SO_4 es a 0.5 M y que la concentración óptima de levadura es de 0.05 mg/L con un pH no mayor a 8.

Según Mbajiuka *et al.*, (2015), la cáscara de cacao, como muchos otros materiales ricos en celulosa, puede utilizarse para la producción de etanol, con la ventaja de convertir residuos en productos útiles. La hidrólisis se llevó a cabo con ácido clorhídrico (HCl) 1 M durante 4 horas a 75 °C. La prueba de Fehling confirmó la presencia de glucosa con 15 °Bx que para mayor rendimiento fue incrementado a 24 °Bx con la adición de sacarosa. Tras el transcurso de 7 días de fermentación los °Bx descendieron de 24 a 2 °Bx. Luego de la destilación y como producto final se obtuvo 10.3% de etanol.

En el trabajo de titulación de Y. J. Torres (2016), con tema “Caracterización de Biomasa Lignocelulósica (*Thebroma Cacao L*) para la obtención de etanol por vía fermentativa”, se obtiene el valor en relación de celulosa 27,04% , hemicelulosa

7,997% y lignina 45,39%, que son los tres componentes principales de los cuales depende la obtención de etanol.

Uno de los estudios del cual se tomó parte del procedimiento, es el de Miftahul & Asip (2015), en el que se realizó el aprovechamiento de residuos de la industria del coco. La fibra de coco se sometió a un pre-tratamiento alcalino al 3% con el propósito de liberar y eliminar la lignina. Como resultado obtuvieron que el mejor tratamiento para la fibra de coco se dio al 4% de H₂SO₄ con 7 días de fermentación.

En el estudio de Huynh Phong *et al.*, (2016) sobre las condiciones de fermentación para la producción de bioetanol a partir del hidrolizado de la cáscara de cacao, se puede concluir que las concentraciones de etanol 4.14-4.19% (w/v) se alcanzaron a los 9 días de fermentación, a una temperatura de 30 °C, pH de 5.5 y con un contenido de 8.6% (p/v) de azúcares fermentables presentes en el hidrolizado, consiguiendo así un consumo de azúcar de 97.54-97.56%.

Por otra parte, existe la investigación de Shet, Sanil, *et al.*, (2018) en la cual se realizó la optimización de la hidrólisis ácida sobre la cáscara de cacao, utilizando HCl en concentración 3.6 N, en un tiempo de 7.36 h. Se obtuvo un hidrolizado con una concentración de 4.09 g/L de azúcares reductores. Se preparó el inóculo de la levadura *Pichia stipitis* en concentración al 2%, logrando así la conversión a etanol de 2 g/L tras 72 h de fermentación.

Además, Novizar Nazir *et. al.*, (2016), desarrollaron un estudio sobre la optimización del pre-tratamiento de la cáscara de cacao, mediante la intervención de varios solventes químicos (NaOH, H₂O₂ y H₂SO₄), aplicando el Método de Superficie de Respuesta (RSM) como modelo estadístico. El pre-tratamiento químico se optimizó

aplicando NaOH en concentraciones de 4-8% (p/v), con un tiempo de reacción de 60-100 min., y una relación de biomasa a disolvente de 1:15-1:25 (p/v). Las condiciones óptimas resultantes fueron a una concentración de NaOH del 4% (p/v), con un tiempo de reacción de 100 min., y relación de biomasa disolvente de 1:25 (p/v).

En el análisis químico de la cáscara de cacao realizado por Sánchez, Soler, & Herguido (2018), se obtuvieron los siguientes valores promedio: 53.7% celulosa, 18.7% hemicelulosa, 25.7% lignina y 2.00% cenizas.

Benalcazar (2018), evaluó la eficacia de distintos pre tratamientos químicos sobre la cáscara de cacao, empleando ácido sulfúrico, hidróxido de sodio, hidróxido de amonio y agua a diferentes tiempos de reflujo. Después de cuantificar la cantidad de etanol presente mediante Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas (GC-MS), pudo corroborar que el mejor tiempo de reflujo se dio en 4 horas con un pre-tratamiento alcalino (NaOH), se presenció mayor cantidad de celulosa y menor de lignina en valores de 55.19% y 24.43%.

En el estudio realizado por Delgado, Soler, & Peña (2018) se hizo uso de un biorreactor para optimizar el proceso de obtención de bioetanol a partir del mucilago de cacao, se determinó que el tiempo óptimo de producción se dio a las 34.5 horas con una temperatura de 35 °C, con pH de 4 y una concentración de levadura de 3 g/L.

2.3 Fundamentos teóricos

2.3.1 Combustible

Es aquella sustancia que al oxidarse libera gran cantidad de energía, su composición puede variar pero entre sus componentes siempre habrá carbono e hidrógeno. Al clasificar a los combustibles según el tiempo de formación, se pueden distinguir dos

tipos. Existen los combustibles fósiles, que son el producto de una composición lenta de materia orgánica que puede tardar miles de años en formarse, por ello son considerados como fuente no renovable. Entre los combustibles fósiles está el petróleo, gas natural y el carbón mineral. Otro tipo de combustible, que al contrario del anterior, se puede generar en un corto tiempo son los biocombustibles. Estos son de origen biológico y son el bioetanol, biodiesel y el biogás (Revista Química, 2013)

2.3.2 Biocombustible

El término de biocombustible, hace referencia aquellos combustibles alternativos que se producen a partir de biomasa. La biomasa al ser materia orgánica de origen vegetal o animal representa fuentes renovables de energía casi inagotables. Por lo que se considera como el único sustituto viable a los combustibles convencionales obtenidos de fuentes fósiles (Salinas & Gasca, 2009).

Los combustibles biológicos pueden reemplazar a los combustibles comunes. La materia prima se puede cultivar, e incluso se pueden aprovechar aquellos residuos generados de cultivos existentes destinados para otra actividad. La sustitución de los combustibles tradicionales por el biocombustible puede evitar aproximadamente el 50% de las emisiones generadas por el uso de la gasolina o el gasóleo (Serna, Barrera, & Montiel, 2011) .

La COPA (Comité de Organizaciones Profesionales Agrícolas de la Comunidad Europea) y la COGECA (Comité General de la Cooperación Agrícola de la UE), hacen distinción entre dos tipos de biocombustibles; sólidos, cuya función es de generar vapor y electricidad; líquidos, para uso de automoción como combustibles (M Ballesteros, Ballesteros, Oliva, & Navarro, 1998).

Los combustibles líquidos son:

1. Bioetanol.- los azúcares que se obtienen a partir de distinta materia orgánica, se transforman mediante un proceso de fermentación para obtener alcohol etílico.
2. Bioaceites.- es el aceite vegetal que se extrae de plantas oleaginosas y que al mejorar sus propiedades fisicoquímicas se asemeja al diésel.

2.3.3 Etanol

El etanol o alcohol etílico, con fórmula química $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$, es una cadena compuesta de dos átomos de carbono unidos por un enlace simple, que a su vez está enlazado a un grupo hidroxilo. Se obtiene al fermentar los azúcares presentes en distintas materias vegetales como es la caña de azúcar, remolacha, maíz, cereales, o biomasa en general.

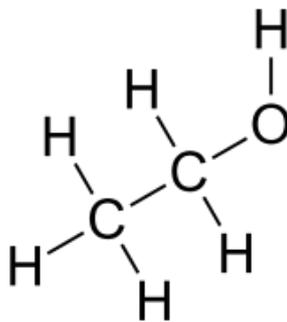


Ilustración 1. Fórmula química del etanol

Fuente: Autor

Es considerado como fuente de combustible renovable, ya que son varias las materias primas que se pueden emplear para su obtención, en especial aquellas que generen un alto rendimiento de glucosa. Las biorefinerías son las plantas productoras de etanol encargadas de su extracción empleando técnicas de ingeniería semejantes al

de la gasolina, incluyendo procesos de destilación y deshidratación (Alvarez, Evelson, & Boveris, 2008).

El etanol es mezclado a distintas proporciones con la gasolina, con la finalidad de complementarla, brindándole mayor estabilidad y restando su volatilidad lo que facilita su uso, almacenamiento y transporte. Entre mayor sea el porcentaje de etanol en la mezcla va a tener menor impacto contaminante, debido a que este va a liberar menos monóxido de carbono (Salinas & Gasca, 2009). Dichas mezclas dan origen a los siguientes biocombustibles (RFA, 2017):

- E5: es la más usada, y resulta de la mezcla de 5% de etanol y 95% de nafta. Está autorizada por la regulación europea y se empezó a usar en el Ecuador desde el 2010.
- E10: contiene 10% de etanol y 90% de nafta. Es mayormente empleada en los Estados Unidos, debido a que esta proporción es tolerada por los motores sin la necesidad de modificación alguna. Como beneficio se obtiene un octano más en la gasolina y la reducción en emisión de gases.
- E85: mezcla de 85% de etanol y 15% de nafta, es empleada en motores especiales. Algunas de las marcas más importantes fabrican vehículos con motores modificados, que cuentan con sensores capaces de determinar la mezcla de carburante y así ajustarse automáticamente a cualquier relación de nafta y alcohol.
- E95 y E100: se mezcla del 95% hasta 100% de etanol, no son muy comunes y se necesita de motores especiales. Brasil es uno de los países con mayor uso.

- E-Diésel: el etanol se mezcla con gasoil mediante la ayuda de un aditivo solvente, logrando como producto un biocombustible diésel. Se expende en los Estados Unidos, Brasil y próximamente en Europa.
- ETBE (etil ter-butyl éter): es un aditivo de la nafta, es menos volátil y más miscible.

2.3.3.1 Propiedades del etanol

En la tabla 1 se realiza una comparación entre las propiedades del etanol y la gasolina.

Tabla 1. Propiedades del etanol

PROPIEDAD	ETANOL	GASOLINA
Peso molecular	46.7	100-105
Carbono (% peso)	52.2	85-88
Hidrógeno (% peso)	13.1	12-15
Oxígeno (% peso)	34.7	0
Presión de vapor Reid (psi)	2.3	8-15
Índice de octano (R+M)/2	108/92	100/90
	100	86-94
Solubilidad en agua 70°F (% Vol.)	100	-
Punto de congelación °F	-173.2	-40
Flash point °F	55	-45
Temperatura de autoignición	793	495

Fuente: (Díaz & Herrera, 2003) tomado por (IMP, 2017)

2.3.3.2 Etanol de primera generación

También conocido como etanol convencional. La biomasa es cultivada con el solo propósito de generar combustible. Su producción es mucho más simple y económica debido a la tecnología que se implementa en comparación con la de segunda generación. La mayor parte de la producción de etanol de primera generación es obtenida a partir del cultivo de la caña de azúcar y del maíz, estos cultivos son de alto

rendimiento y han sido implementados a nivel mundial. De una tonelada de maíz se obtiene 402 litros de etanol, mientras que de una tonelada de caña de azúcar se puede producir 85 litros (Cavieres, 2008).

Para producir cantidades significativas de etanol se necesita de grandes extensiones de cultivos, reduciendo espacio para tierras cultivables destinadas para la alimentación de la población. La tecnología que se requiere para producir a gran escala, no siempre está al alcance de pequeños agricultores. Por lo general la producción se encuentra acaparada por las grandes industrias, desplazando al campesino y al mismo tiempo encareciendo ciertos productos (Salinas & Gasca, 2009).

2.3.3.3 Etanol de segunda generación

Los CSG al igual que los de primera tienen como propósito disminuir la contaminación y dependencia a los combustibles fósiles, pero tienen beneficios mucho más prometedores e ideales. La gran diferencia está en la procedencia de los insumos, se utilizan residuos agrícolas y forestales, siendo así una alternativa renovable que no compite con los cultivos alimentarios (Faba, Díaz, & Ordóñez, 2014). Algunos ejemplos de biomasa lignocelulósica empleada son: el bagazo de la caña de azúcar, aserrín, ramas, cáscaras, hojas, etcétera. Se estima que se produce y a la vez se desperdicia cerca de 40 millones de toneladas de materia vegetal (Sanderson, 2012).

Aunque este tipo de etanol suene mucho más conveniente de producir, enfrenta ciertos obstáculos, ya que se debe emplear tecnologías mucho más complejas y con costos de producción elevados. El proceso implica la conversión de celulosa en azúcares mediante la aplicación de enzimas o sustancias químicas, para luego ser fermentadas que darán como resultado etanol (IICA, 2007b). La biomasa

lignocelulósica es más dura y por ende más difícil de tratar, está compuesta de lignina, celulosa y hemicelulosa. El futuro del biocombustible de segunda generación depende de la investigación para desarrollar métodos que resulten rentables y eficientes (FAO, 2008).

2.3.3.4 Etanol de tercera generación

También denominados “cultivos energéticos”, son cultivos vegetales no alimenticios de crecimiento rápido. Dentro de esta categoría se siembran pastos perennes, plantas o árboles pequeños, algunas algas verdes y verdeazules. Su producción esta aún en etapa de investigación y se desarrolla a nivel piloto (Medina, 2008).

2.3.3.5 Etanol de cuarta generación

Es aquel que en su proceso se aplica bacterias genéticamente modificadas con dióxido de carbono o alguna otra fuente que contenga carbono. Su producción se encuentra aún en etapa de desarrollo e investigación por lo que no es comercializado (IMP, 2017).

2.3.3.6 Aplicaciones actuales del etanol

En la actualidad el etanol es producido en mayor cantidad debido a la acogida que ha tenido los biocombustibles en países desarrollados y últimamente en países en vías de desarrollo. Brasil, uno de los mayores productores de etanol a partir del cultivo de caña de azúcar, mezcla en proporciones iguales al etanol con gasolina. Estados Unidos, así mismo gran productor de etanol a base de maíz busca reemplazar el uso de aditivos en la gasolina, con el fin de reducir las emisiones de gases que contribuyen al calentamiento global. Otros países de Europa Occidental producen etanol a partir de cultivos como el trigo y la remolacha, aplicando subsidios internos y barreras aduaneras

para proteger la producción interna y productores locales. El uso cada vez más frecuente de etanol ha impulsado a la industria automotriz, a la fabricación de vehículos capaces de funcionar ya sea con gasolina o etanol o una mezcla de ambos. Estos vehículos se denominan Flexible Fuel Vehicles (FFV), que con la ayuda de un sensor puede reconocer el tipo de combustible que se utiliza así ajustando la carburación del motor en función de esta (Escalante & Fuentes, 2013)

2.3.3.7 Situación internacional del etanol

Se prevé que la producción mundial de etanol pasará de 120 MmL en 2016 a 137 MmL en 2026. De los 137 MmL producidos en el 2026 el 55% provendrá del maíz mientras que el 35% de cultivos de azúcar. Durante este periodo no se espera gran evolución para aquellos biocombustibles basados en residuos, debido a la falta de inversión en investigación y desarrollo (OCDE/FAO, 2017).

La Unión Europea se rige por las Directivas de Energía Renovables 2009 y de Calidad de los Combustible (RED), así como también de la Directiva ILUC de 2015 y por las legislaciones nacionales. Se espera que la proporción de la energía total de transporte representada por los biocombustibles, incluido el doble recuento de los biocombustibles basados en desperdicios y residuos, alcance el 6.4% para el 2020. El resto del objetivo RED del 10% deberá ser recaudado de otras fuentes de energía renovable. Según datos, se espera que Tailandia se involucre como uno de los países importantes en los mercados de biocombustible. El gobierno busca incrementar el uso con un sistema de tributación diferencial y subsidio que beneficie las mezclas de etanol en la gasolina. El gobierno de India seguirá impulsando la producción a base de melaza.

En china se prevé que el uso de etanol aumentara a 1 MmL ya que así estable las normas obligatorias, el etanol se produce a partir del maíz y yuca (OCDE/FAO, 2017).

2.3.3.8 Situación nacional del etanol

La gasolina ECOPAÍS es el único biocombustible existente en el Ecuador, está compuesta por un 95% de combustible fósil y 5% de etanol. El etanol que se utiliza para crear esta mezcla proviene de cultivos de caña de azúcar. ECOPAÍS es un biocombustible que cumple con los parámetros establecidos por la norma de calidad INEN, que indica que debe tener entre 85 y 87 octanos. Esta gasolina reduce la producción de nafta alto octanaje en un 14%, atributo que le confiere el alto octanaje del etanol a la mezcla (Urgilés & Erreyes, 2018).

Algunas de las empresas que compran el etanol de los productores locales son Producargo, Soderal y Codona. Dichas destilerías acondicionan al insumo para entregarlo a Petroecuador que se encarga de realizar la mezcla ecopaís. En el 2019 las tres empresas alcoholeras entregarían a Petroecuador una cantidad de 110.5 millones de litros de etanol, donde 3.79 millones de litro provendrían de productores artesanales (Pacheco, 2019).

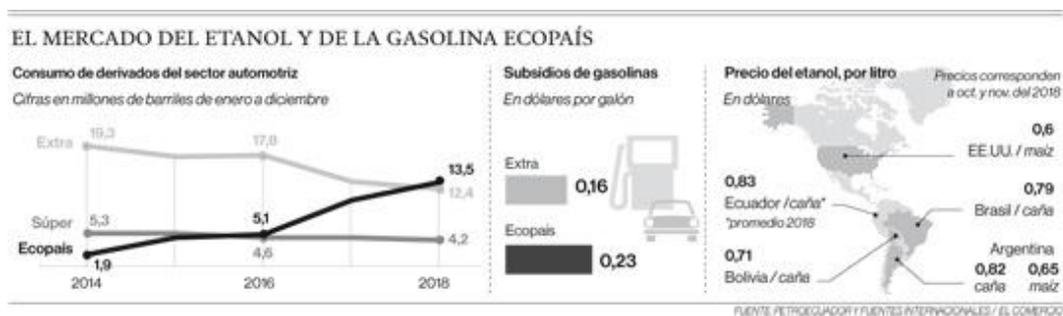


Ilustración 2. Consumo de derivados del sector automotriz, subsidios de gasolinas y precio del etanol en el Ecuador.

Fuente: El comercio (2019).

2.3.4 Biomasa

El termino biomasa hace referencia a toda la materia orgánica, contempla: plantas, arboles, o desechos metabólicos de los animales, que pueden generar productos energéticos. Los materiales de origen biológico para la obtención de dichos productos, provienen de diversas fuentes, dentro de este grupo se consideran los residuos de la agricultura e industria forestal (tallos, ramas, hojas, frutos, semillas, etc.), y residuos urbanos (basura orgánica, aguas hervidas y otros). Mediante la aplicación de procesos y tecnología de conversión a gran escala la biomasa puede servir para la producción de biocombustibles, los cuales buscan la sustitución de combustibles fósiles.

A la biomasa se la puede clasificar según su procedencia en (Cortes, 2011):

- Biomasa primaria.- este tipo de biomasa proviene directamente de seres fotosintéticos, su origen vegetal hace que sea abundante y renovable. Dentro de este grupo también se incluyen los residuos agrícolas y forestales.
- Biomasa secundaria.- es la materia procesada por seres heterótrofos, que al consumir la materia primaria la convierten en materia fecal y que también puede ser conformada por la carne de los animales.
- Biomasa terciaria.- este tipo de biomasa es generada por seres que se alimentan de biomasa secundaria.
- Biomasa natural.- es la biomasa producida en ecosistemas silvestres y se genera sin la intervención el hombre. Gran parte de la biomasa 40% que se genera en el planeta proviene de los océanos.

- Biomasa residual.- como su nombre lo indica se genera en calidad de residuos como resultado de las actividades humanas. Los residuos agrícolas y forestales pueden ser muy variados y generados en grandes cantidades.
- Cultivos energéticos.- son cultivos destinados a la producción de biocombustibles. Se diferencian de los cultivos agrícolas tradicionales debido a que se siembran a gran escala y comprenden características como resistencia a sequía, enfermedades, etc.

2.3.4.1 Biomasa lignocelulósica

El material lignocelulósico esta compuesto de tres polímeros; celulosa, hemicelulosa y lignina, que a la vez se encuentran envueltos en una compleja estructura (Sanchez Riaño, Gutiérrez Morales, Muñoz Hernández, & Rivera Barrero, 2010). La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas, le confiere forma y rigidez brindándole soporte estructural. La presencia de estos tres polímeros (lignina, celulosa y hemicelulosa) varían en concentraciones según la especie, edad y fase de crecimiento de la planta (Cuervo, Folch, & Quiroz, 2009).

Es un material abundante sobre la tierra, tiene una producción anual cerca a los 200 000 millones de toneladas. Dentro de este grupo se encuentran residuos agrícolas, forestales y agroindustriales, lo que hace que su producción sea masiva. La alta disponibilidad y su bajo costo de producción hacen de este un material de interés para la industria de biocombustible. Aunque todo parece apostar por los combustibles a base de biomasa lignocelulósica, el gran problema radica en la tecnología que se ha venido implementando, ya que los procesos a la cual tiene que ser sometida hace que su costo de producción no compitan con el combustible común (Corredor & Pérez, 2018).

La biomasa lignocelulósica se puede clasificar en seis grupos; residuos agrícolas, maderas duras, maderas blandas, residuos celulósicos, biomasa herbácea, y residuos sólidos urbanos.

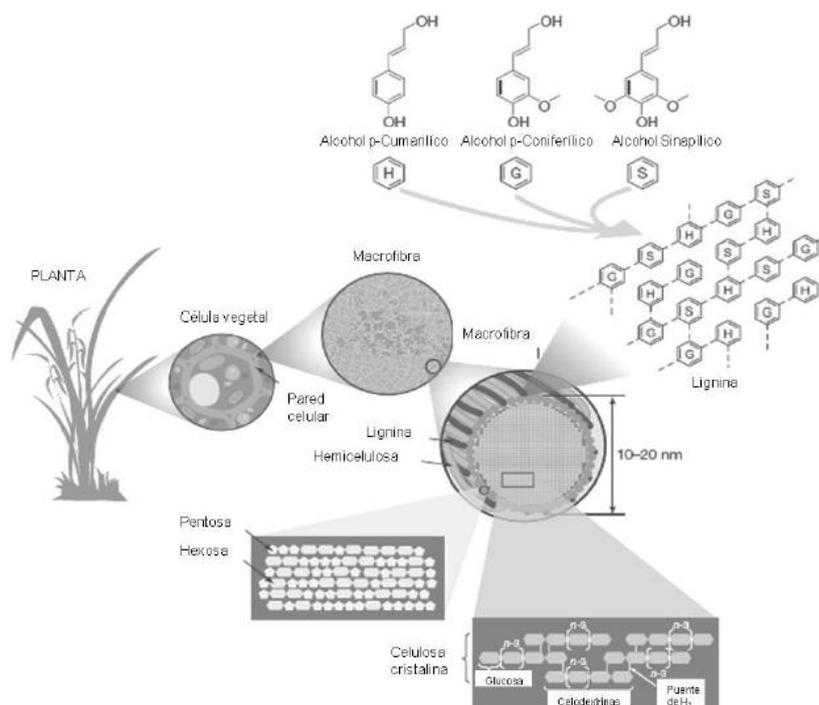


Ilustración 3. Materia lignocelulósica y sus tres polímeros (Celulosa, hemicelulosa y lignina).

Fuente: (Cuervo *et al.*, 2009) tomada de Rubín 2008.

2.3.4.2 Celulosa

La celulosa es un homopolímero polidisacárido conformado por subunidades de D-glucosa que a su vez se encuentran unidas a un enlace glucosídico β 1-4 (Cortes, 2014). En su estado natural, la celulosa se estructura en capas de fibrillas cristalinas, las fibrillas son individuales y débilmente unidos por enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van de Waals intramoleculares. Los enlaces de hidrógeno le confiere rigidez al

material, y si estos son escasos la celulosa se denomina amorfa, por lo que la disposición espacial de los enlaces determinan las formas cristalinas (Cuervo *et al.*, 2009).

Según su macroestructura cristalina, la celulosa puede clasificarse en celulosa I, II, III y IV. La clase I se encuentra por lo general en la pared celular. La II, es termodinámicamente estable, y se genera debido a la cristalización de la primera o de la mercerización en hidróxido de sodio. Ambas clases deben ser consideradas para emplear el pre-tratamiento (Guarnizo, Martínez, & Valencia, 2009).

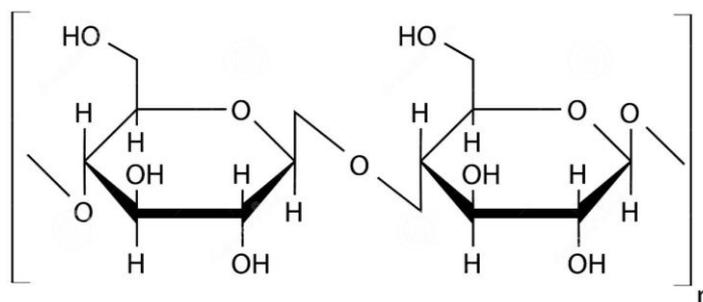


Ilustración 4. Fórmula química del polímero de la celulosa

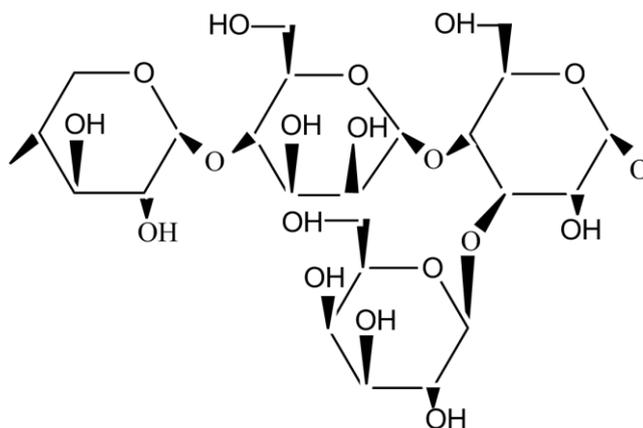
Fuente: Autor

2.3.4.3 Hemicelulosa

Es una estructura compleja y ramificada de carbohidratos, formada por la unión de azúcares como son las pentosas (D-xilosa y L-arabinosa), hexosas (D-manosa, D-glucosa y D-galactosa) y ácidos de azúcar (4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico). Estos azúcares por lo general se encuentran unidos mediante enlaces β -1,4 y en ocasiones por enlaces β -1,3 (Cuervo *et al.*, 2009).

La hemicelulosa tiene menor peso molecular en comparación con la celulosa y sus cadenas laterales son más cortas, formando así una estructura amorfa más fácil de hidrolizar (Cortes, 2011).

La hemicelulosa sirve como intermediaria para conectar a la lignina con las fibras de celulosa, y le confiere rigidez al conjunto de celulosa-hemicelulosa-lignina (Sanchez Riaño *et al.*, 2010).



-Xilosa-β (1-4)- Manosa- β (1,4)- Glucosa-alfa (1,3)- Galactosa

Ilustración 5. Fórmula química de la hemicelulosa

Fuente: Autor

2.3.4.4 Lignina

Es considerado como uno de los polímeros más abundantes entre la biomasa, y al igual que la celulosa y hemicelulosa se encuentra en la pared celular del material vegetal. La lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado constituido por unidades de fenilpropano (p-coumaril, coniferil y alcohol sinapílico) que están unidos por distintas clases de enlaces (Guarnizo *et al.*, 2009). Es insoluble en agua y ópticamente inactivo, por lo que es difícil de degradar. Debido a la resistencia que presenta ante la degradación química y biológica, se debe aplicar un proceso de pre-tratamiento e hidrólisis más severo si se pretende eliminar. La lignina tiene como función principal brindar soporte estructural, impermeabilidad, protección contra el

ataque microbiano y el estrés oxidativo. También cumple con mantener unidos a la celulosa y hemicelulosa (Cortes, 2014).

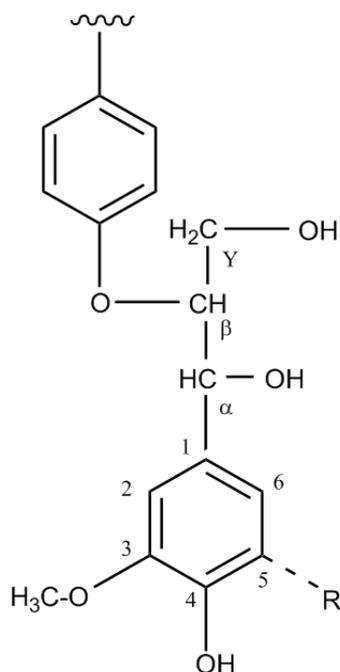


Ilustración 6. Fórmula química de la lignina.

Fuente: Autor

2.3.5 Materiales Lignocelulósicos

Las características de los componentes de estos materiales hace posible el aprovechamiento para la obtención de etanol (celulosa y hemicelulosa), combustible, adhesivos o inmunoadyuvantes (biomasa y lignina). Las actividades agroindustriales y forestales son las que generan mayor cantidad de residuos lignocelulósicos, que pueden ser aprovechados (Viñals, Bell, Michelena, & Ramil, 2012) .

Entre los desperdicios o subproductos agroindustriales que más importancia se le ha dado para la producción de biocombustible están aquellos provenientes de las frutas; residuos de la industria azucarera, bagazo, cachaza, la paja y el cogollo; cascarilla de arroz; bagazo y cáscara de cítricos; residuos de la industria del banano; zuro de maíz;

residuo de la producción de tequila, bagazo de agave; cáscara de café; residuos de material verde, cáscaras, hojas, bagazo de frutas, entre otros (Corredor & Pérez, 2018)

Tabla 2. Materiales lignocelulósicos y sus principales componentes

Material Lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Madera dura	40-55	24-40	18-25
Madera suave	45-50	25-35	25-35
Cáscara de nuez	25-30	25-30	30-40
Olote de maíz	45	35	15
Desechos de pastos	25-40	35-40	18-30
Papel	85-99	0	0-15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-20	80-85	0
Algodón	80-95	0	0
Papel periódico	40-55	25-40	18-30
Desecho de papel de pulpeos químico	60-70	10-20	5-10
Desechos sólidos de aguas residuales	8-15	ND	24-29
Desechos animales (cerdos)	6	28	ND
Desechos sólidos de ganado	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
Hierba Burmuda	25	35.7	64
Pastos de crecimiento rápido.	45	31.4	12

Fuente: (Cuervo *et al.*, 2009)

2.3.6 Cacao

El cacao, cuyo nombre científico es *Theobroma cacao L.* es un árbol pequeño que alcanza una altura promedio de 5.10 m, es conocido por su apetecido fruto ya que de sus pepas se elabora todo tipo de chocolates y dulces derivados de este. Es un cultivo agroalimentario tropical que crece en ambientes húmedos de Centroamérica y Sudamérica, su origen y domesticación no se conoce con certeza por lo que se mantiene en debate (Martínez-Ángel, Ortíz-Rodríguez, & Villamizar-Gallardo, 2015).



Ilustración 7. Fruto Theobroma cacao L.

Fuente: (Salas & Yunuen, 2015)

Existen tres tipos de cacao destinados para la producción a mayor escala denominados: criollo, forastero y trinitario. El criollo se cultiva principalmente en países de América del Sur y América Central, su fruto es de coloración rojo o amarillo, la pared de la cáscara es fina y sus semillas son grandes de color blanco/purpura. Es de esta clase que se obtiene el chocolate de más alta calidad, pero es el cultivo que menos se desarrolla debido al bajo rendimiento y su susceptibilidad a enfermedades. El cacao forastero se adapta al clima de la cuenca del Amazonas, el fruto es de pared gruesa y de color amarillo, con semillas planas y coloración purpura. Este tipo de cacao es de mayor producción y es el más utilizado para sembrar. Finalmente está el cacao trinitario, como resultado de la combinación del criollo y forastero, del cual se obtiene chocolate de alta calidad (De la Cruz, Vargas, & Del Angel, 2011).

En el Ecuador se siembra la variedad de cacao CCN-51, los frutos son de color rojizos al alcanzar la madurez, tiene una alta capacidad productiva en comparación a las demás variedades, pudiendo llegar a producir cuatro veces más y resulta ser conveniente para los agricultores por ser resistentes a enfermedades. La producción es

extensa y de gran demanda en el mercado internacional. Los países productores de cacao son: Costa de Marfil, Ghana, Brasil, Indonesia, Malasia, Nigeria, Camerún, Ecuador, Colombia, y México (UNESCO, 2008).

2.3.6.1 Cultivo de cacao en el Ecuador

Ecuador se encuentra posicionado como primer exportador de cacao fino de aroma, con una producción de más del 62% a nivel mundial. El cultivo de cacao es una de las actividades agroindustriales de mayor importancia, promueve el desarrollo social y económico de nuestro país con una producción anual que representa el 6,7% del PIB. La producción se desarrolla principalmente en las provincias de Los Ríos, Manabí, Guayas y en menor cantidad en las provincias de Esmeraldas, el Nororiente y El Oro. Las provincias de la sierra que se dedican también a esta actividad en menor proporción son Cotopaxi, Bolívar y Cañar. La extensión total de tierras cultivadas es de 560.387 hectáreas que representa alrededor de 150.000 familias involucradas en la industria cacaotera (ILAC, 2018).

2.3.6.2 Composición química del cacao

El cacao tiene aproximadamente 300 compuestos volátiles, entre estos: ésteres, monocarbonilos, hidrocarburo-lactonas, piroles entre otros. También abarca un montón de compuestos que le confieren su color, textura, aroma y sabor, tiene cerca de 18% de proteínas de las cuales 8% son digeribles; grasas, aminas y alcaloides (trobramina 0.5-2.7%, cafeína 0.25-1.43%, tiramina, dopamina, salsolinol, trigonelina, ácido nicótico y aminoácido libres, taninos, fosfolípidos, etc.)

La cáscara de cacao que representa la mayor parte del fruto, con base en cenizas libres, contiene un aproximado de 35 %p de lignina, 30 %p de celulosa y 10 %p de

hemicelulosa, el restante corresponde a extractos. La ceniza representa del 10-15 %p y es la fracción inorgánica de la biomasa (Martínez-Ángel *et al.*, 2015)

En las siguientes tablas se ha tomado información recolectada por Kely Ortiz-Valbuena & Ricardo Álvarez-León, en las que se presenta la composición química de tres partes principales del fruto del cacao.

Tabla 3. Composición química de la cáscara externa del fruto del cacao

Componente	% p/p
Humedad	85
Proteína	1,07
Minerales	1,41
Grasa	0,02
Fibra	5,45
Carbohidratos	7,05
N	0,171
P	0,026
K	0,545
Pectinas	0,89

Fuente:(Álvarez-León & Ortíz-Valbuena, 2015)

Tabla 4. Composición química del grano de cacao

Componente	% p/p
Manteca de cacao	54
Proteína	11,5
Ácidos orgánicos y aromas	9,5
Celulosa	9
Ácidos tánicos y color	6
Agua	5
Sales minerales	2,6
Teobromina	1,2
Azúcares	1
Cafeína	0,2

Fuente: (Álvarez-León & Ortíz-Valbuena, 2015)

Tabla 5. Composición química del mucilago del cacao

Componente	% p/p
Agua	79,2-84,2
Proteína	0,09-0,11
Azúcares	12,50-15,9
Glucosa	11,6-15,32
Pectinas	0,9-1,19
Ácido cítrico	0,77-1,52
Cenizas	0,40-0,50

Fuente: (Álvarez-León & Ortíz-Valbuena, 2015)

2.3.6.3 Residuos de la industria cacaotera

La cáscara de cacao es el residuo de mayor volumen que genera la agroindustria cacaotera, la semilla que es la única parte aprovechable representa tan solo el 10% del fruto fresco, el resto se considera desperdicio del proceso de producción. Al extraer la pulpa y semillas del cacao, la cáscara representa el 52 a 70% del peso húmedo del fruto y su valor calórico es de 17 a 22 MJ kg⁻¹. Una vez cultivado el fruto la cáscara se retira y se reincorpora al suelo en condición de composta o de forma directa en el mismo predio o en terrenos aledaños. Tomando en cuenta la gran cantidad de material residual esta práctica no siempre es la más adecuada ya que puede generar impactos negativos, como la propagación de patógenos (Villamizar, Rodríguez, & León, 2017). La pulpa y la cáscara más que abono puede ser fuente de contaminación de suelos y cuerpos de agua, además pueden causar olores desagradables y deterioro del paisaje (Villagómez & Argüello, 2013).

2.3.6.4 Cáscara de cacao como materia prima energética

Los materiales residuales generados por la agroindustria no compiten con el suministro de alimentos, más bien se basa en el aprovechamiento de biomasa para

generar productos como el etanol. La cáscara de cacao se puede utilizar para generar combustible de segunda generación que puede resultar beneficioso para: 1) evitar el pronto agotamiento de recursos fósiles no renovables, 2) disminuir el efecto invernadero causado por la liberación de CO₂, 3) desarrollo de fuentes de energía independientes, 4) generación de empleo en áreas rurales, 5) la reducción de contaminación, proliferación de patógenos y erosión de suelo (Martínez-Ángel *et al.*, 2015)

Varios países Latinoamericanos poseen condiciones idóneas para la producción de biocombustibles, las alternativas de cultivos tropicales y subtropicales hacen que estos tengan un mejor balance energético y ambiental en comparación con países del Norte del Hemisferio (IICA, 2007^a).

Tabla 6. Balance energético y ambiental de cultivos para la producción de etanol y biodiesel

	Etanol		Biodiesel	
Balance energético (Unidad retornada de energía no renovable usada)	Trigo	2	Girasol	3.2
	Remolacha	2	Canola	2.7
	Maíz	1.5	Soya	3
	Caña de azúcar	8.3	Palma	9
Balance ambiental (GHG emisiones por tonelada de petróleo, en toneladas equivalentes de CO²)	Remolacha	2.17	Soya	2.6
	Trigo	1.85	Canola	1.79
	Caña de azúcar	0.41	Palma	1.73
	Paja	0.33	Madera	0.27

Fuente: (Unión Europea, 2017) citado en (IICA, 2007^a)

2.3.7 Tratamientos para la obtención de etanol

La compleja composición del material lignocelulósico hace que el proceso de conversión a etanol sea más laborioso. Existen cuatro etapas esenciales para la conversión a etanol que a su vez pueden desarrollarse de distintas formas, estas son: pretratamiento (reducción de tamaño del material), tratamiento, hidrólisis, y fermentación.

2.3.8. Pre-tratamiento

Es la primera etapa a la cual se somete la biomasa con la finalidad de mejorar el rendimiento de obtención de azúcares fermentables. Estos procesos deben ser escogidos según la materia prima a trabajar para así obtener los más altos rendimientos. En el caso de materiales lignocelulósicos, se emplean condiciones químicas agresivas por lo que es importante tomar en cuenta los costes de tratamiento para que sean lo más económicos posibles.

- a) Pre-tratamiento mecánico (físico): el material se somete a un proceso de trituración, con la finalidad de reducir el tamaño de partícula y la cristalinidad. Un material más pequeño permitirá mayor contacto de superficie específica y reducción del grado de polimerización (DP). A mayor área de superficie específica se reducirá el DP, logrando de esta forma incrementos del 5 al 25% en la hidrólisis (Sanchez Riaño *et al.*, 2010). Al finalizar esta etapa y si el material lo requiere se puede aplicar algún otro pre-tratamiento (biológico, térmico, ácido o alcalino) con el fin de descomponer la lignina y hemicelulosa.
- b) Pre-tratamiento biológico: su fundamento está en exponer al material lignocelulósico a la acción de ciertas enzimas o microorganismos con el propósito

de degradar a la lignina y la hemicelulosa. Por lo general, al escoger un pre-tratamiento biológico, va a ser necesario empezar con un tratamiento con hongos seguido por uno con enzimas. El tratamiento con hongos se puede realizar con hongos de podredumbre entre otros. Los hongos de podrición blanca han demostrado tener una acción eficaz para tratar materiales lignocelulósicos. Además, se han desarrollado trabajos con la intervención de microorganismos como el *Aspergillus terreus*, *Trichoderma Spp.*, *Cyathus stercoreus*, *Penicillium camemberti*, *Streptomyces griseus*, *Penicillium camemberti*, *Streptomyces griseus*, así como el uso de enzimas como la peroxidasa, manganasa, lactasa, etc (Ríos, 2015).

- c) Pre-tratamiento térmico: consiste en someter al material lignocelulósico a temperaturas entre los 150 a 180 °C. La temperatura puede ser mayor, ya que la reactividad térmica va a depender del material que se utilice y su composición. Existen tres formas para llevar a cabo este tipo de pre-tratamiento y es mediante vapor de agua, explosión por vapor y con agua caliente (LHW). Al aplicar estos procedimientos parte de la hemicelulosa se hidroliza formando ácidos que funcionan como catalizadores de la misma hemicelulosa durante la fase de hidrólisis (Cortes, 2014).
- d) Pre-tratamiento ácido: este tipo de pre-tratamiento puede ejecutarse con ácidos diluidos o concentrados. Al combinar a la biomasa con ácido, se va a solubilizar a la hemicelulosa mientras que la lignina soluble se condensa y precipita. Estos efectos son mucho más pronunciadas en ácido concentrado que en ácido diluido por lo que este tipo de pre-tratamiento no es muy recomendable para la obtención de

etanol. El pre-tratamiento de ácido diluido es mucho más conveniente, por el hecho de que la formación de reacciones secundarias puede ser eliminada. (Cardona & Orrego, 2009).

- e) Pre-tratamiento alcalino: este pre-tratamiento va a dar lugar a dos tipos de reacciones, siendo estas la solvatación y la saponificación que como resultado va a provocar que el material se hinche haciéndolo más accesible a enzimas y bacterias. A altas concentraciones de alcalinidad se puede provocar una hidrólisis alcalina, la degradación y disolución de los polisacáridos disueltos. Algunos efectos no deseados de este pre-tratamiento pueden ser la solubilización, redistribución y condensación de la lignina, contrarrestando así los efectos positivos de la eliminación de lignina e hinchamiento de la celulosa. Otro aspecto a tomar en cuenta es que el álcali puede provocar un cambio en la estructura de la celulosa, haciéndola más termodinámicamente estable y densa que aquella sin tratar (Cardona & Orrego, 2009).

2.3.9 Técnicas de hidrólisis y fermentación

2.3.9.1 Hidrólisis y fermentación separadas (SHF)

Este tipo de procedimiento hace referencia aquel que se realiza en distintos tiempos, de este modo se lleva a cabo primeramente la fase de hidrólisis y después la de fermentación. La ventaja de realizar estos procesos por separado es que se puede trabajar con condiciones específicas e idóneas de cada cual, por ejemplo al emplearse una hidrólisis enzimática con celulasas estas van a necesitar de temperaturas superiores a otros microorganismos empleados para la fermentación (Ríos, 2015).

2.3.9.2 Sacarificación y fermentación simultaneas (SSF)

A diferencia del SHF esta técnica ofrece aplicar ambos procesos a la par, y al igual que la anterior presenta sus ventajas, por lo que ambos procesos podrían funcionar en relación a las condiciones que se necesita, por lo que se debe analizar y estudiar para escoger el método de conveniencia. Una de las ventajas que se presentan al elegir este proceso es que los azúcares fermentables producidos pueden inmediatamente ser fermentados reduciendo así la formación de inhibidores de las materias primas (Ríos, 2015).

2.3.10 Hidrólisis

Hidrólisis proviene de las palabras griegas en la que *hidros* significa agua y *lisis* significa ruptura. El objetivo de la hidrólisis es desorganizar la estructura celular de la biomasa empleada, para exponer la celulosa presente en ella, con la finalidad de facilitar la acción de las enzimas o ácidos que se apliquen para la obtención de azúcares fermentables. La efectividad y velocidad de la hidrólisis dependen de varias factores como el Ph, temperatura, la concentración de la biomasa hidrolítica, el tipo de biomasa empleada, y el tamaño de partícula (Aguilar, 2010).

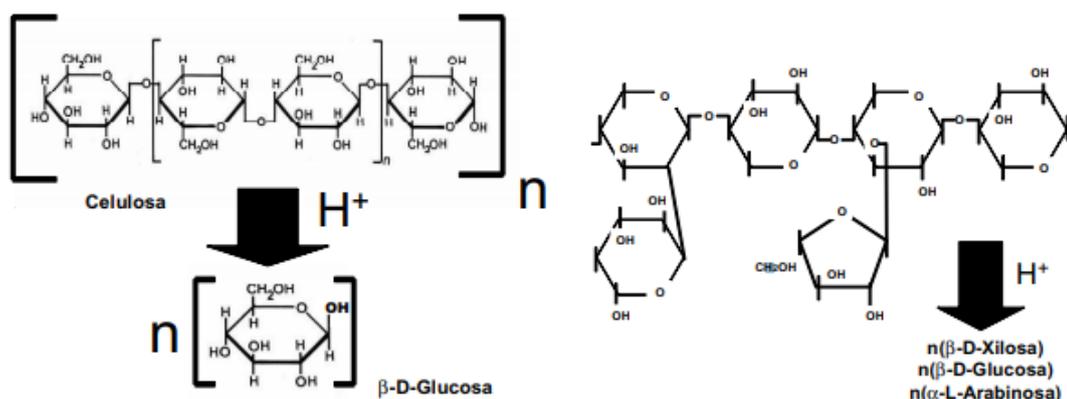


Ilustración 8. Estructura química: hidrólisis de materiales lignocelulósicos

Fuente: (Aguilar, 2010)

2.3.10.1 Hidrólisis ácida

Es un método antiguo, que reporta ser efectivo y tener altas tasas de reacción. En la actualidad, este tipo de hidrólisis se utiliza en su mayoría como un pre-tratamiento anterior a la hidrólisis enzimática, con la finalidad de deslignificar y obtener la mayor cantidad posible de celulosa (Aguilar, 2010). El ácido sulfúrico es el reactivo con mayor uso en la hidrólisis ácida, se puede emplear diluido, a una concentración al 5% con rendimientos del 100% a 160 °C, o concentrado al 77% con temperaturas más bajas entre los 120-160 °C. Al emplear ácidos existe la posibilidad que ocurran reacciones de condensación y eliminación que pueden resultar en la formación de sustancias tóxicas como es el hidrocimetilfurfural, que afecta a la levadura (Guarnizo *et al.*, 2009).

Los productos que se obtienen de los hidrolizados ácidos celulósicos y hemicelulósicos son la celobiosa, glucosa y xilosa (Aguilar, 2010). Dichos azúcares pueden ser fermentados en un proceso posterior para obtener como producto final etanol (Jaramillo, 2013).

2.3.10.2 Hidrólisis enzimática

Es considerada como la mejor opción para la producción de etanol. Durante esta etapa se utilizan enzimas en vez de ácidos y se trabaja a temperaturas entre los 30 a 50 °C, reduciendo así la degradación de azúcares presentes. En el aspecto económico, tomando en cuenta el tipo de enzima que se emplee y optimizando el proceso puede resultar 4 veces más económico que la hidrólisis ácida (G. Álvarez, Bell, Ramil-Mesa, & Viñas, 2012). Se emplean enzimas denominadas celulasas que tienen una alta especificidad. Las celulasas se encargan de catalizar la reacción con el propósito de degradar la celulosa presente en azúcares fermentables (Sanchez Riaño *et al.*, 2010).

Las celulasas pueden ser producidas por bacterias u hongos capaces de actuar en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Durante la hidrólisis, por lo general se da una mezcla de varias enzimas, entre estas al menos tres grupos de celulasas se encuentran involucradas. Los tres grupos principales de enzimas celulasas son las endoglucanasas, exoglucanasas y las β -glucosidasas. Otras enzimas encargadas de degradar la hemicelulosa son las glucorinadasas, acetilsterasas, xilanasas, galactomanasas, entre otras (Aguilar, 2010).

2.3.11 Fermentación

2.3.11.1 Fermentación alcohólica

Es una bioreacción, en la que los azúcares son degradados en alcohol y dióxido de carbono con la intervención de microorganismos, como por ejemplo, la levadura. Este proceso involucra varios factores que hacen que sea más compleja de lo que parece ser a simple vista. La glucosa es degradada a dos moléculas de alcohol y dos de bióxido de carbono, al mismo tiempo que el microorganismo se nutre de la glucosa y otros

nutrientes para reproducirse (Vázquez & Dacosta, 2007). La ecuación de conversión se representa según la siguiente ecuación:



Los criterios a considerar para lograr condiciones idóneas son: el microorganismo a emplear que debe ser seleccionado según la materia prima con la que se va a trabajar, método de pre-tratamiento, y tipo de hidrólisis. A parte de las condiciones indicadas existen otras variables que influyen en los procesos de fermentación como es el Ph, temperatura, y concentración de sustratos. El microorganismo mayormente estudiado y empleado para la obtención de etanol es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, investigaciones indican que el mejor rendimiento se obtiene con un Ph de 5.0 y una temperatura de máximo 37 °C (Vázquez & Dacosta, 2007) .

2.3.11.2 Microorganismos empleados en la fermentación

Algunos de los microorganismos empleados para la conversión de azúcares a etanol son la *Candidatropicalis* y *Candidalusitanie* usados en algas; *Saccharomyces cerevisiae* que es la levadura tradicional utilizada a través de los años para la producción de etanol; *Pichiastipitis* (KCTC7228), *Pachysolentannopilus* (KCTC7229) y *Kloeckerasporaosmophila* (KCCM50548) utilizadas sobre algunas algas (Sanchez Riaño *et al.*, 2010).

2.3.12 *Saccharomyces cerevisiae*

Es una levadura heterótrofa con una amplia aplicación, su alta capacidad fermentativa ha hecho que se venga utilizando desde la antigüedad para la elaboración de pan, cerveza, vino, etc.

2.3.12.1 Morfología

Son considerados como hongos unicelulares y por lo general sus células son ovaladas pero también pueden ser esféricas, cilíndricas o elípticas y alcanzar un diámetro máximo de entre 4-5 μm . Su reproducción se da por fisión binaria o gemación y algunas pueden ser dimórficas o bifásicas (Suárez-Machín, Garrido-Carralero, & Guevara-Rodríguez, 2016)

2.2.12.2 Metabolismo

La *Saccharomyces cerevisiae* cuenta con dos tipos de metabolismo siendo estos oxidativo o respiratorio y metabolismo fermentativo. El primero hace referencia a un metabolismo aerobio que necesita de oxígeno para su crecimiento mientras que el segundo se vale del proceso de fermentación para producir energía.

El metabolismo de la *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación alcohólica se da inicio con la ruta metabólica conocida como glucólisis, que conlleva a la formación de dos moléculas de piruvato por cada molécula de azúcar metabolizada. Luego, el piruvato se descarboxila y como resultado se produce el etanol y CO_2 .

2.2.12.3 Factores para el crecimiento y desarrollo de la levadura

- a) Presión osmótica: la levadura se nutre mediante un proceso osmótico, por lo que se debe evitar medios hipertónicos o hipotónicos. El estrés osmótico puede causar alteración en cuanto a volumen celular, velocidad de fermentación y viabilidad celular (Suárez-Machín et al., 2016)
- b) Temperatura: es un factor que debe mantenerse regulado puesto a que si la temperatura se encuentra muy elevada va a provocar la muerte de la levadura y

obtención de reacciones secundarias, mientras que una temperatura muy baja no permitirá la activación de las mismas.

- c) Luz: los microorganismos que no poseen clorofila se desarrollan mejor en ausencia de luz ya que esta resulta ser perjudicial para su crecimiento.
- d) Ph: las levaduras pueden tolerar condiciones de Ph entre 3-10, pero se desarrollan idóneamente en un medio ligeramente ácido con un Ph entre 4.5-6.5, estos rangos pueden variar según la cepa que se utilice (Suárez-Machín *et al.*, 2016)

CAPÍTULO 3

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1 Nivel y diseño de investigación

La siguiente investigación se basa en el método cuantitativo científico. Dicho método consiste en la recolección e interpretación de los datos de las variables planteadas (pH, tiempo y temperatura de fermentación), con el fin de determinar las condiciones óptimas de fermentación para la obtención de bioetanol a partir del hidrolizado ácido de la cáscara del cacao (*Theobroma cacao*) proveniente de la industria cacaotera del Ecuador.

Se trata de una investigación explicativa, debido a que se busca el porqué de los hechos mediante el establecimiento de relaciones causa-efecto. Las causas establecidas serían la temperatura, pH y tiempo de fermentación, mientras que el efecto se considera el rendimiento de bioetanol.

El diseño de la investigación es combinado, ya que se aplica tanto un diseño de tipo documental como uno experimental. El desarrollo del presente estudio se basó en la investigación bibliográfica obtenida de distintas fuentes electrónicas como lo son las páginas web, revistas, artículos científicos, libros, tesis, entre otros. La fase experimental inicia cuando la cáscara del cacao es sometida a determinadas condiciones (variable independiente), para observar los efectos o reacciones que se producen (variable dependiente).

3.1.1 Población y muestra

Se consideró como población la cantidad de material (cáscaras de cacao) recolectado para llevar a cabo la experimentación. Este material fue tomado de una finca cacaotera

situada en la parroquia La Cuca del cantón Arenillas de la Provincia de El Oro. Se realizó un fraccionamiento de la población principal para luego tomar las muestras que se sometieron a los distintos procedimientos con la finalidad de obtener etanol.

Al recoger el material se consideraron varios factores de modo que la materia (cáscara) fuese lo más homogénea posible, es decir; estado de madures óptimo, eliminación de materia extraña presente y daños en la estructura.

3.1.2 Variables

3.1.2.1 Independientes

Las variables independientes del presente estudio son las siguientes:

- Temperatura: es una de las variables a controlar, es importante determinar a qué temperatura se obtiene mayor rendimiento de etanol puesto a que la fermentación se realiza con la intervención de levadura, que va a funcionar según las condiciones a la que es expuesta.
- pH: el hidrolizado se ajustó a distintos valores de pH para su posterior fermentación, con el propósito de determinar cuál de estos valores es el más apropiado para mayor rendimiento de etanol.
- Tiempo de fermentación: este tipo de variable es considerada cualitativa dicotómica simple, la fermentación se controla en prolongación de días (3 hasta 7 días) para definir el tiempo de fermentación óptimo.

3.1.2.2 Dependiente

El rendimiento de bioetanol es el resultado de la intervención de las variables independientes a las cuales se expuso el hidrolizado de la cáscara de cacao durante la fase de fermentación. Las condiciones de temperatura, tiempo y pH afectan

directamente el rendimiento, por lo que mediante la comparación de los resultados se determinó cuál de estas generan la optimización para la obtención de etanol.

3.1.2.3 Intervinientes

Las variables intervinientes en este caso son el tamaño de la partícula, la composición química, y el pre-tratamiento alcalino de la cáscara de cacao. Estas variables fueron desde un principio controladas y definidas para que no intervengan en el proceso de obtención de etanol estableciendo un tamaño específico de partícula en microgramos. La determinación de la composición química de la cáscara se analizó para conocer la disponibilidad de conversión, así como también se escogió un pre-tratamiento alcalino basado en bibliografía.

3.2 Técnicas empleadas

3.2.1 Técnicas e instrumentos para la recolección de datos

Las técnicas empleadas para la recopilación de datos han sido varias entre estas; revisión bibliográfica, revisión de contenidos, y técnica de observación; para las cuales se utilizaron instrumentos como: base de datos, computadora, gestores bibliográficos y unidades de almacenamiento. La parte práctica del proyecto se evidenció mediante la técnica de observación en conjunto con instrumentos como fotografías, fichas de laboratorio y videos.

3.2.2 Técnicas de análisis y procesamiento de datos

Las técnicas de procesamiento de datos se desarrollan mediante; la clasificación, tabulación y comparación de datos. Los resultados son expresados por metodología de superficie de respuesta (MSR) con el fin de evaluar la interacción entre múltiples variables (pH, temperatura y tiempo de fermentación) y su impacto en la variable de

respuesta: la concentración de etanol. Las herramientas a emplear son gráficos, tablas, proyecciones y regresiones en las que se plasmaran los resultados obtenidos.

3.4 Procedimientos

El siguiente proyecto de investigación se desarrolló empleando métodos teóricos de consulta bibliográfica, para luego ponerlos en práctica mediante métodos empíricos en la fase de experimentación.

3.4.1 Acondicionamiento de la muestra

3.4.1.1 Recolección de la muestra

La cáscara de cacao se recolectó de una finca cacaotera ubicada en la parroquia La Cuca del cantón Arenillas, de la provincia de El Oro. Se recogieron tras la cosecha del cacao en condición de desechos. Las cáscaras se encontraban en el suelo al pie de las plantas de cacao en buen estado y partidas por la mitad.

3.4.1.2 Reducción de tamaño

Una vez recolectadas, las cáscaras se introdujeron en una trituradora mecánica con el propósito de reducir su tamaño a un aproximado de 3 cm de diámetro para así poder continuar con el protocolo establecido.



Ilustración 9. Trituración mecánica de las cáscaras de cacao

Fuente: Autor

3.4.1.3 Secado

Este paso se realizó con el propósito de eliminar la humedad presente en la cáscara. Se extendió las cáscaras trituradas sobre una lona y se expuso al sol durante una semana, volteando cada dos horas para un secado homogéneo. La humedad se midió en el equipo Moisture Analyzer HB43-S hasta alcanzar un valor entre los 9-10 % MC.



Ilustración 10. Proceso de secado de la cáscara de cacao

Fuente: Autor

3.4.1.4 Disminución del tamaño

La disminución de partícula se logró con la intervención de dos equipos: primero se pasó las cáscaras previamente trituradas y secas por un molino de mano que redujo significativamente su diámetro, y luego, se procesó en un molino de corte mecánico con malla de 2 mm (Retsch SM 100).



Ilustración 11. Molinos empleados para la disminución de partícula de la cáscara.

Fuente: Autor

3.4.1.5 Tamizado

El material se colocó en un tamizador vibratorio con mallas de abertura entre los 20 a 80 μm con la finalidad de obtener específicamente el diámetro de 80 μm como lo indica el protocolo establecido. Luego se almacenó en una bolsa plástica sellada hasta su posterior uso.

3.4.2 Caracterización química de la cáscara

La determinación del contenido de lignina, celulosa, hemicelulosa, proteína, cenizas y humedad fue realizada por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en el laboratorio de servicio de análisis e investigación en alimentos. El método aplicado es el de la Universidad de Florida bajo normativa 1970 “Análisis proximal”.

3.4.3 Tratamientos

3.4.3.1 Pre-tratamiento alcalino

El siguiente tratamiento fue replicado según el estudio de Bioethanol Production from Coconut Fiber Using Alkaline Pretreatment and Acid Hydrolysis Method (Miftahul & Asip, 2015). Se pesó 30 g de la fibra de cáscara de cacao previamente acondicionada y se disolvió en una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 3% (p/v). La mezcla se introdujo en el autoclave a 121 °C durante 90 minutos. Luego, el material se lavó con abundante agua destilada hasta alcanzar un Ph neutro (Ph 7). Se filtró el contenido para así separar la parte sólida que a continuación se secó en un horno a 85 °C durante 4 horas. Finalizadas las horas de secado se almacenó en desecadores hasta su posterior uso. El pre-tratamiento tiene como propósito romper la unión de lignina para facilitar el proceso de hidrólisis.



Ilustración 12. Pre-tratamiento alcalino

Fuente: Autor

3.4.3.2 Tratamiento ácido

La muestra seca pre-tratada se diluyó en 500 ml de agua destilada. En un Erlenmeyer aparte se preparó 300 ml de una solución de ácido sulfúrico al 4% (v/w) y se mezcló con la muestra diluida. La mezcla se introdujo en el autoclave a 121 °C durante 3 horas. Al finalizar el autoclavado se dejó enfriar durante una hora para luego proceder a lavar el material sólido con abundante agua hasta nuevamente ajustar el Ph a neutro. A continuación se filtró para separar la parte sólida y se secó en un horno a 60 °C durante 12 horas. En este paso se eliminó la lignina para obtener la mayor cantidad posible de celulosa.

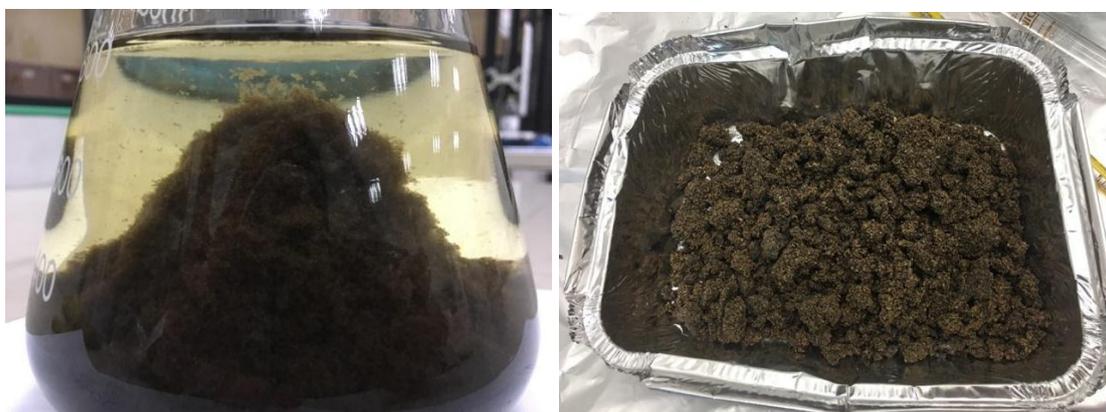


Ilustración 13. Material posterior al tratamiento ácido

Fuente: Autor

3.4.3.3 Hidrólisis ácida

Paso fundamental para convertir a la celulosa en glucosa. Se pesaron 10 g de material celulósico en tres vasos de precipitación y se preparó a distintas concentraciones (50% 60% y 70%) de ácido sulfúrico, con el propósito de determinar cuál de estas concentraciones es la más idónea para la obtención de glucosa. Agitar durante 15 minutos hasta deshacer grumos y obtener una pasta, luego bajar la concentración al 8%

con agua destilada y calentar a 60 °C durante 2 horas agitando constantemente. A continuación se dejó reposar hasta enfriar la solución y se procedió a filtrar al vacío para obtener el líquido que contiene los azúcares fermentables. Al líquido se le ajustó el Ph según las variaciones que indicó el modelo estadístico con hidróxido de sodio (NaOH).

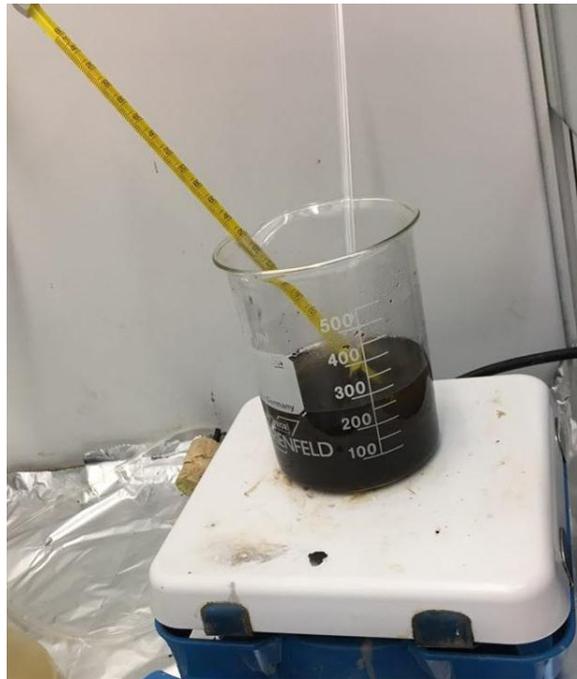


Ilustración 14. Hidrólisis ácida

Fuente: Autor

También se procedió a realizar pruebas de Fehling A y Fehling B para corroborar la presencia de azúcares fermentables en el hidrolizado (Ver Ilustración 15), como también la medición de grados Brix (°Bx).

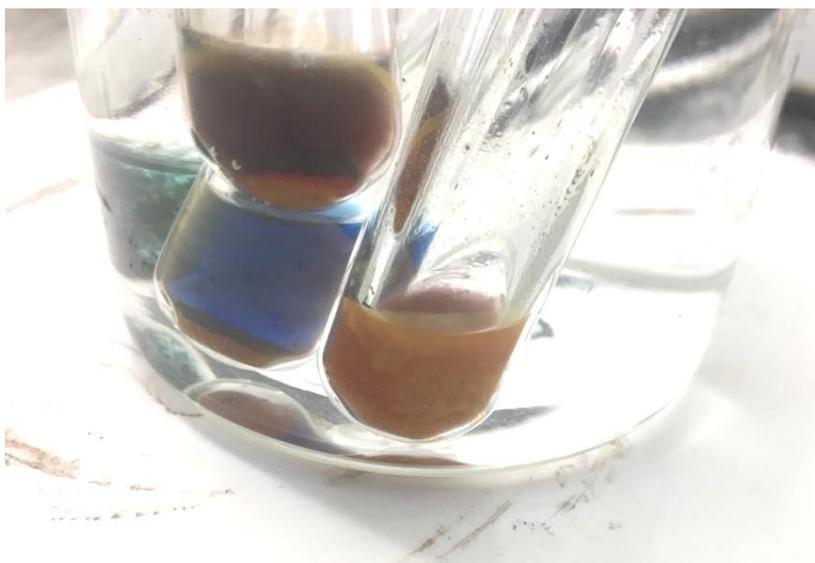


Ilustración 15. Prueba de Fehling positiva

Fuente: Autor

3.4.3.4 Prueba de Fehling A y Fehling B

La cuantificación de azúcares fermentables presentes en el hidrolizado se realizó mediante el método de titulación Fehling, indicado por Concha (2014). En un matraz se preparó una mezcla de 10 ml de Fehling A, 10 ml de Fehling B y 25 ml de agua destilada y se calentó en una hornilla hasta ebullición constante. En una bureta se colocó hidrolizado y se dejó caer su contenido gota a gota sobre el matraz, agitando constantemente hasta lograr el viraje a un color pardo o rojo ladrillo característico de esta prueba. Para cuantificar, se verificó el volumen gastado del hidrolizado de la cascara de cacao, y mediante la siguiente fórmula se obtuvo los valores [ver Anexo 2]:

$$g \text{ de azúcares reductores totales} = \frac{\textit{Titulo de Fehling}}{\textit{Gasto de lactosuero}} \times 100$$

Fuente: (Concha, 2014)

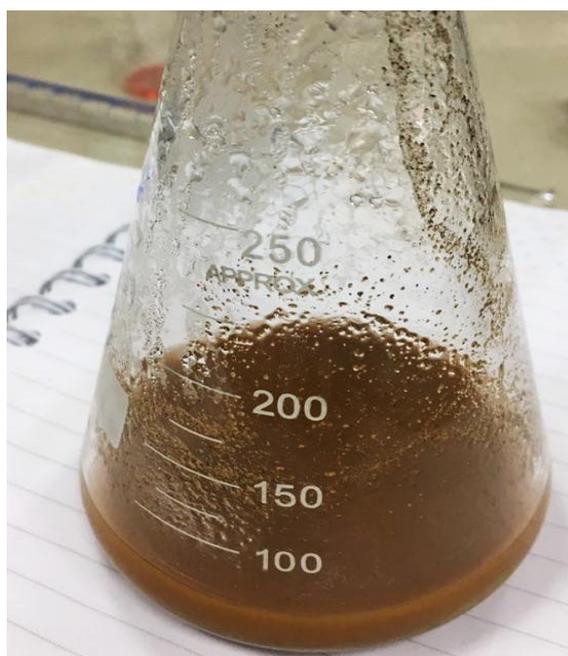


Ilustración 16. Prueba cuantitativa de azúcares reductores, método Fehling.

Fuente: Autor

3.4.3.5 Fermentación alcohólica

La fermentación se llevó a cabo con la intervención de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual ha sido empleada satisfactoriamente a través de los años para la producción de alcohol (Peña & Arango, 2009).

La optimización del proceso se realizó aplicando el método estadístico de superficie de respuesta (RSM) que indicó realizar 26 variaciones de las variables independientes que en este caso son Ph, temperatura y tiempo de fermentación.

Preparación del inóculo: La levadura al 0.5% se activó con agua tibia y sacarosa. Se dejó reposar durante 4 horas a una temperatura de 30 °C hasta observar abundante espuma y luego se añadió al hidrolizado.



Ilustración 17. Activación de Saccharomyces cerevisiae

Fuente: Autor

Proceso de fermentación: Las condiciones de fermentación se regularon en el equipo MaxQ 4000 Benchtop Orbital Shaker. La fermentación que se llevó a cabo es de tipo anaeróbica por lo que el hidrolizado se colocó en matraces con corchos en ausencia de luz y con agitación constante.

3.4.3.6 Fermentación en biorreactor

Con la finalidad de replicar el protocolo a mayor escala, se escogió el proceso que rindió los mejores resultados, con las variables más óptimas que en este caso fueron: temperatura de 25 °C, Ph 4.5 y 3 días de fermentación. Se preparó 2 L de hidrolizado y se puso a fermentar en el equipo LAMBDA MINIFOR Laboratory fermenter-biorreactor que sirve para llevar acabo fermentación microbiana de alta densidad con bacterias, levaduras, hongos, etc.

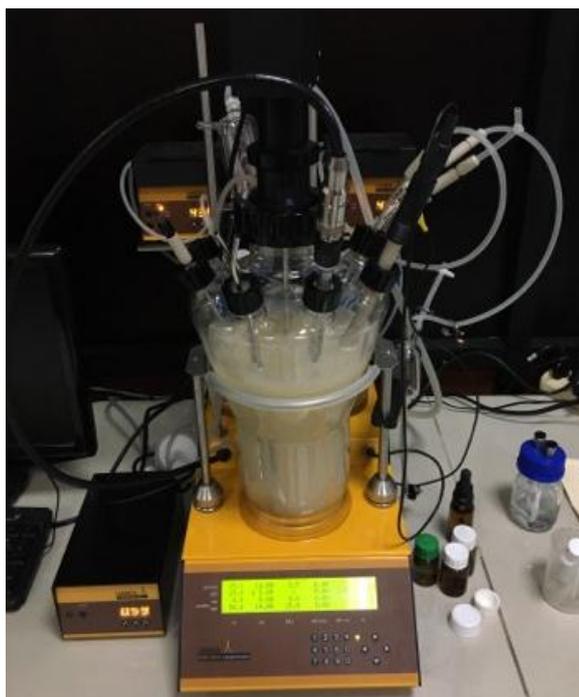


Ilustración 18. Fermentación en biorreactor LAMBDA MINIFOR

Fuente: Autor

3.4.3.7 Destilación simple por arrastre de vapor

La destilación se realizó según los días indicados en tiempo de fermentación a una temperatura de 70 °C. Una vez destilado el producto se midió la cantidad obtenida y se envasó en frascos que luego fueron colocados en refrigeración hasta su posterior análisis.



Ilustración 19. Destilación del fermentado

Fuente: Autor

3.4.4 Análisis Químico

3.4.4.1 Detección por cromatografía de gases (GC)

La determinación de etanol se realizó mediante la técnica de cromatografía de gases (GC). Se prepararon las muestras patrón a distintas concentraciones de etanol industrial. Ver Anexo 3 para curva de calibración. Luego, se corrieron las muestras experimentales y se compararon con las muestras patrón con el propósito de determinar su contenido de etanol. La técnica consiste en la volatilización del contenido que a su vez se inyecta en la cabeza de la columna de cromatografía. Se analizó un total de 31 muestras, incluyendo las 30 del modelo estadístico y aquella resultante del biorreactor.

En el cromatograma [Anexo 4], se puede evidenciar los picos pertenecientes a la presencia de etanol. El registro gráfico bidimensional muestra en color azul el pico de la muestra optimizada y en color fucsia el pico de la muestra del biorreactor.



Ilustración 20. Cromatógrafo de Gases, Thermo Scientific.

Fuente: Autor

3.4.5 Análisis Estadístico

Se utilizó el programa Minitab® que es una herramienta software estadística, que permite realizar diseños experimentales y optimizar procesos. En esta ocasión se creó un diseño de superficie de respuesta (RSM) empleando las variables dependientes (temperatura, Ph y tiempo) con respecto al rendimiento de etanol, con la finalidad de optimizar el proceso y así poder identificar cuáles son las condiciones óptimas de fermentación.

El diseño experimental en el caso de estudio es de tipo Box-Behnken (3, 4, 5, 6, 7, 9 ó 10 factores continuos), con 3 factores continuos. Para cada factor se escogió 2 rangos: temperatura (25-35), Ph (4-6) y tiempo (3-7).

Tabla 7. Factores considerados, modelo Box Behnken.

Factor	Nombre	Bajo	Alto
A	Temperatura	25	30
B	Ph	4	5
C	Tiempo	3	7

Fuente: Autor

Los factoriales que ayudan a identificar los factores significativos y las regiones de respuesta óptima, indicaron que se debían aplicar 15 tratamientos con 2 repeticiones, haciendo un total de 30 muestras experimentales. En la Tabla 8 se encuentran las conjugaciones factoriales que se debe aplicar en los procesos de fermentación para alcanzar la optimización mediante el modelado de las respuestas. En el Anexo 3, se detalla los datos y promedios resultantes de las corridas experimentales.

Tabla 8. Corridas base, diseño Box Behnken.

	Temperatura	Ph	Tiempo (días)
1	25	4	5
2	25	5	3
3	25	5	7
4	25	6	5
5	30	5	5
6	30	5	5
7	30	5	5
8	30	4	7
9	30	6	3
10	30	6	7
11	30	4	3
12	35	5	7
13	35	5	3
14	35	6	5
15	35	4	5

Fuente: Autor

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización química de cáscara de cacao (*Theobroma cacao*)

En la Tabla 9 se encuentran expresados los valores porcentuales del análisis bromatológico de la cáscara de cacao. Se tomaron en cuenta parámetros de mayor importancia para esta investigación, como lo es la celulosa, hemicelulosa y lignina.

Tabla 9. Composición química de la cáscara de cacao

Muestra	Análisis	Método	Resultado %
Cáscara de cacao (<i>Theobroma cacao</i>)	Celulosa	MO-LSAIA-02.02 U.FLORIDA 1970	29.07
	Hemicelulosa	MO-LSAIA-02.01 U.FLORIDA 1970	2.97
	Lignina	MO-LSAIA-02.03 U.FLORIDA 1970	33.90
	Cenizas	MO-LSAIA-01.02 U.FLORIDA 1970	12.04
	Proteína	MO-LSAIA-01.03 U.FLORIDA 1970	5.93
	Humedad	MO-LSAIA-01.01 U.FLORIDA 1970	8.22
	F.D.N	MO-LSAIA-02.01 U.FLORIDA 1970	65.74
	F.D.A	MO-LSAIA-02.02 U.FLORIDA 1970	62.97

Fuente: Autor

Los resultados indican que la composición fisicoquímica de la cáscara de cacao es de un 29.07% de celulosa, 2.97% de hemicelulosa y 33.90% de lignina. El compuesto de mayor interés en este caso es principalmente la celulosa, pues a partir de esta se obtiene la transformación a azúcares reductores que mediante la fermentación se convertirá en etanol. La hemicelulosa y lignina son compuestos que requieren de procesos aún más complejos, por lo que un material óptimo sería aquel con menor porcentaje en ambos. Los valores obtenidos en el presente estudio fueron comparados con otros trabajos de investigación. El estudio de Yenifer Torres (2016), sobre la

“Caracterización química de la cáscara de cacao”, presentó porcentajes de 27.04% para celulosa, 2.97% hemicelulosa, y 45.39% lignina. Se puede constatar que los valores entre los dos estudios se asemejan y difieren mínimamente. En la investigación de M. A. Torres, (2019) en el que se analiza la cáscara de cacao mediante el método de análisis TGA, indicó valores (33.45% celulosa, 9.98% hemicelulosa y 14.67 de lignina) que difieren en mayor proporción. Se debe tomar en cuenta que las incompatibilidades pueden estar influenciadas por factores como la variedad de cacao, suelo, clima, método de análisis, entre otros.

4.2 Hidrólisis ácida

Inicialmente, la hidrólisis ácida se realizó en tres concentraciones; al 50%, 60% y 70%, con el fin de identificar a que concentración se obtenía mayor conversión de glucosa a azúcares solubles. La cual se analizó aplicando la técnica de refractometría denominada Grados Brix (°Bx).

Tabla 10. Concentración de H₂SO₄ en el hidrolizado y °Bx correspondientes.

Hidrolizado	Concentración H₂SO₄	Grados Brix (°Bx)
Muestra 1	50%	15 °Bx
Muestra 2	60%	10 °Bx
Muestra 3	70%	6 °Bx

Fuente: Autor

Como se puede apreciar en la Tabla 10, a menor concentración de ácido se obtuvo mejor conversión de celulosa a glucosa. El jarabe glucosado reporto tener mayor °Bx a una concentración del 50% con ácido sulfúrico.

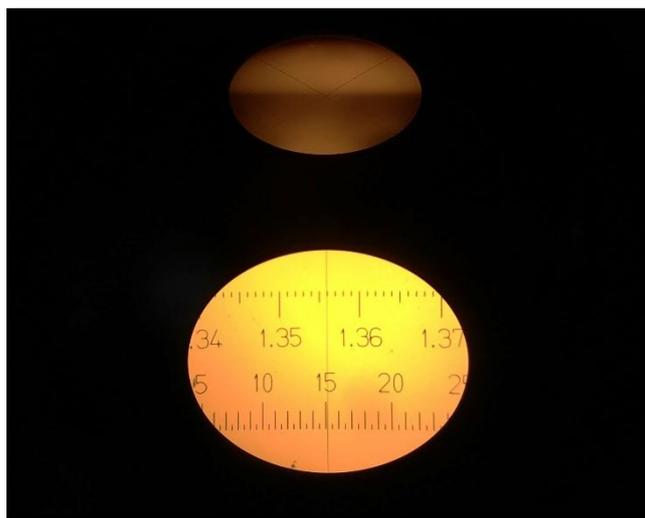


Ilustración 21. °Bx del hidrolizado al 50% de H₂SO₄

Fuente: Autor

4.3 Efectos de las variables independientes (Ph, temperatura y tiempo) en la obtención de etanol

Al finalizar las corridas experimentales de las 30 muestras por el método de cromatografía de gases, se realizó el modelado y la optimización de los datos. El modelado se procedió a analizar mediante el análisis de varianza ANOVA, con pruebas de significación estadística (test F) y test de falta de ajuste del modelo, mientras que la optimización se trató con la Metodología de Superficie de Respuesta [MSR]. Los valores obtenidos se ingresaron en la hoja de trabajo con su respectivo tratamiento, según el diseño Box-Behnken que se creó inicialmente.

Con el propósito de corroborar si el modelo escogido es el adecuado y cumple con los supuestos del análisis se generó la gráfica de Anderson-Darling y la gráfica de Residuos. La gráfica de Anderson-Darling permite verificar si se cumple el supuesto de normalidad en los datos obtenidos [Ilustración 22].

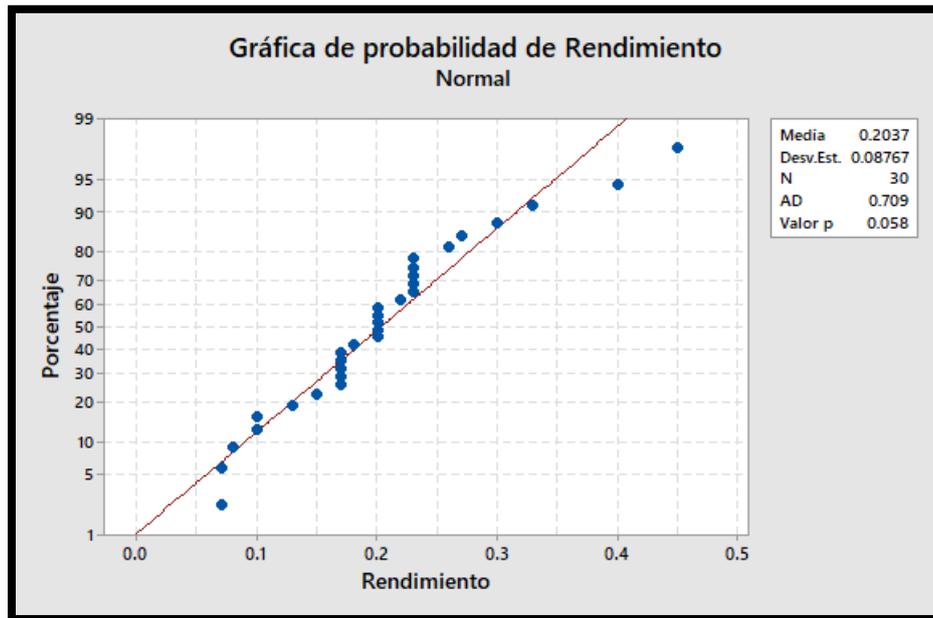


Ilustración 22. Test de Anderson-Darling obtenido del programa Minitab® 18.

Fuente: Autor

El cumplimiento del supuesto de normalidad se verifica con el valor-p. En la presente gráfica se puede observar que el valor-p es de 0.058 siendo mayor al valor de significancia 0.05, lo cual comprueba el cumplimiento de una distribución normal de los resultados.

Para comprobar el supuesto de que los residuos son independientes unos de otros, se emplea la gráfica de Orden versus Residuos. En la Ilustración 23, se puede observar que los residuos se encuentran ubicados aleatoriamente alrededor de la línea central, lo que indica que estos si son dependientes.

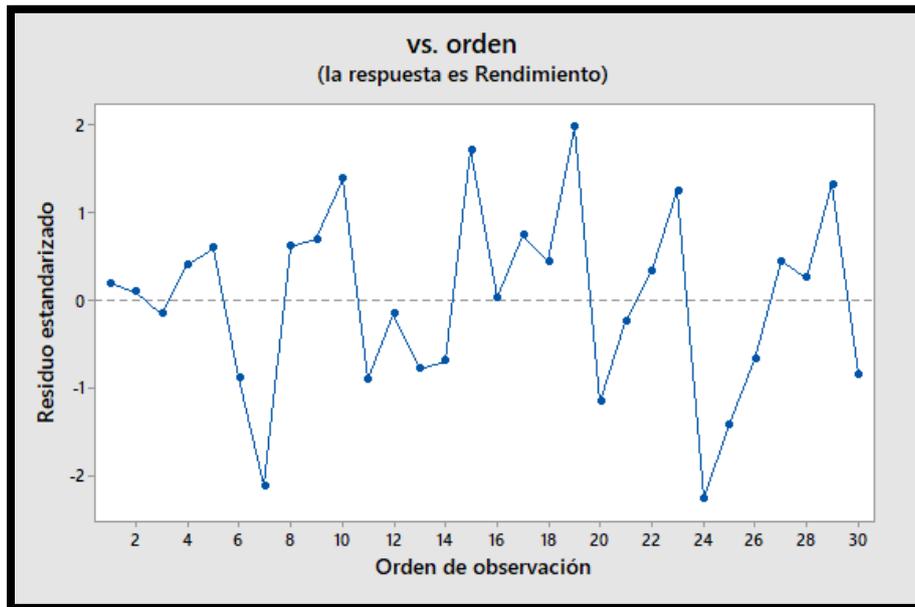


Ilustración 23. Gráfica de residuos vs. orden.

Fuente: Autor.

4.4. Análisis de la varianza (ANOVA) y pruebas de significancia estadística

Una vez demostrada la normalidad e independencia de los datos se procedió con el análisis estadístico, que tiene como propósito indicar cuál de todos los tratamientos es el más óptimo. Los datos fueron analizados con todos los modelos estadísticos disponibles para MSR: lineal, lineal + interacciones, lineal + cuadrados y cuadrático completo. Para cada modelo se consideró tres valores decisivos: valor-p, valor-f y el porcentaje de variabilidad [R^2].

La Tabla 11, representa los valores originales para los cuatro modelos, por lo tanto los términos que proporcionó el programa estadístico Minitab® 18 se mantuvieron fijos.

Tabla 11. Prueba de ajuste en los modelos disponibles

Modelo		Valor-p falta de ajuste	[R ²]	[R ²] Ajustado	[R ²] Predicción
Lineal		0.013	74.09%	71.10%	63.73%
Lineal	+	0.012	77.73%	70.64%	52.82%
Interacciones					
Lineal + Cuadrado		0.046	88.31%	85.27%	79.52%
Cuadrático		0.058	91.29%	87.37%	78.68%
Completo					

Fuente: Autor.

Al examinar el ANOVA de los distintos modelos se presenciaron valores-p >0.05, por lo que se procedió a eliminar aquellos términos que no representaban significancia dentro de los modelados. La Tabla 10 muestra los valores ajustados de los cuatro modelos. En este caso el modelo considerado como el más idóneo fue el cuadrático completo por cumplir con la prueba de falta de ajuste [valor-p > 0.05]. Como se puede apreciar, dicho modelo obtuvo un valor-p de 0.074. Además, el coeficiente de determinación alcanzado con este modelo demuestra el 91.11% de variabilidad de producción de etanol.

Tabla 12. Prueba de ajuste modificada en los modelos disponibles

Modelo		Valor-p falta de ajuste	[R ²]	[R ²] Ajustado	[R ²] Predicción
Lineal		0.013	74.09%	71.10%	63.73%
Lineal	+	0.013	74.09%	71.10%	63.73%
Interacciones					
Lineal + Cuadrado		0.049	88.14%	85.67%	80.79%

Cuadrático	0.074	91.11%	88.78%	82.84%
Completo				

Fuente: Autor

Continuo a la selección del modelo adecuado, se procedió a realizar la prueba de significación estadística (test F) o test de Fisher aplicada. Esta indica que el valor-p debe de ser $[p < 0.05]$ para que el efecto del factor en el modelo sea significativo sobre la respuesta. La Tabla 13 indica que el modelo de regresión es altamente significativo al obtener los siguientes valores; $[F \text{ modelo} = 39.26; \text{valor-p} < 0.05]$.

Tabla 13. ANOVA para la producción de etanol

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	6	0.203071	0.033845	39.26	0.000
Lineal	3	0.165150	0.055050	63.86	0.000
Ph	1	0.042025	0.042025	48.75	0.000
T	1	0.087025	0.087025	100.96	0.000
Tiempo	1	0.036100	0.036100	41.88	0.000
Cuadrado	2	0.031308	0.015654	18.16	0.000
Ph*Ph	1	0.019147	0.019147	22.21	0.000
t*t	1	0.010022	0.010022	11.63	0.002
Interacción de 2 factores	1	0.006613	0.006613	7.67	0.011
t*Tiempo	1	0.006613	0.006613	7.67	0.011
Error	23	0.019826	0.000862		
Falta de ajuste	19	0.018959	0.000998	4.61	0.074
Error puro	4	0.000867	0.000217		
Total	29	0.222897			

Fuente: Autor

4.5 Interpretación de gráficas de efectos para MSR

El Diagrama de Pareto [Ilustración 24] sirve para determinar la magnitud e importancia de los efectos (Minitab, 2019b). Las barras que cruzan la línea de referencia se consideran como estadísticamente significativas. Los factores que se analizaron en este caso (Ph, tiempo y temperatura) son los que influirán sobre la producción de etanol. En la [Ilustración 24] la línea de referencia se encuentra en 2.07 y las barras que sobrepasan a esta línea son los factores B, A, C, AA, BB, y BC. Los factores señalados son los considerados como estadísticamente significativos para la producción de etanol en el nivel de 0.05. Además, el diagrama indica que los factores individuales tienen mayor influencia en comparación con aquellos en interacciones, siendo el factor Ph el que presenta mayor efecto ante los otros términos.

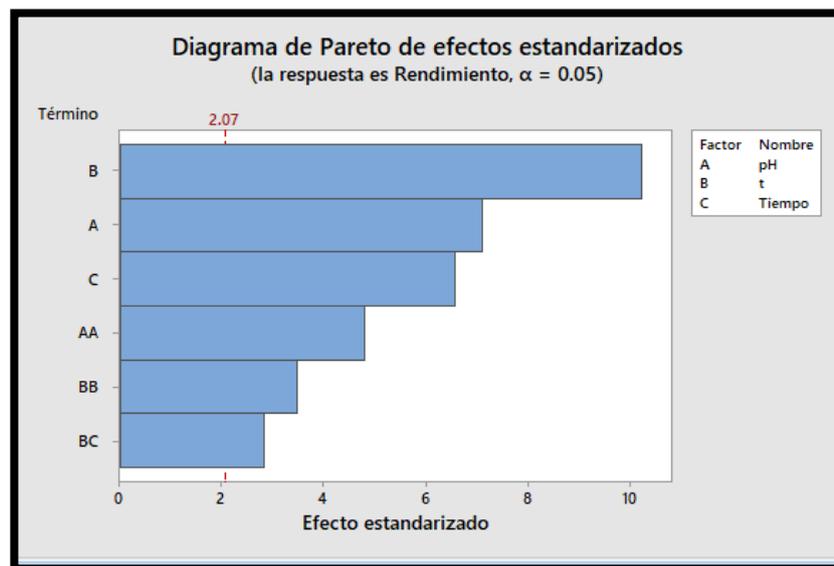


Ilustración 24. Diagrama de Pareto: Ph (A), temperatura (B), tiempo (C)

Fuente: Autor

La gráfica normal de los efectos [Ilustración 25] permite determinar la magnitud, dirección y la importancia que tienen los efectos. Entre más distantes se encuentren los efectos de 0, estos serán mayormente significativos, la distancia entre puntos dependerá del nivel de significancia (Minitab, 2019b). El programa se encarga de diferenciar aquellos considerados estadísticamente significativos con aquellos cuyo efectos sean estadísticamente insignificante marcándolos de forma distinta en color y forma (Minitab, 2019b).

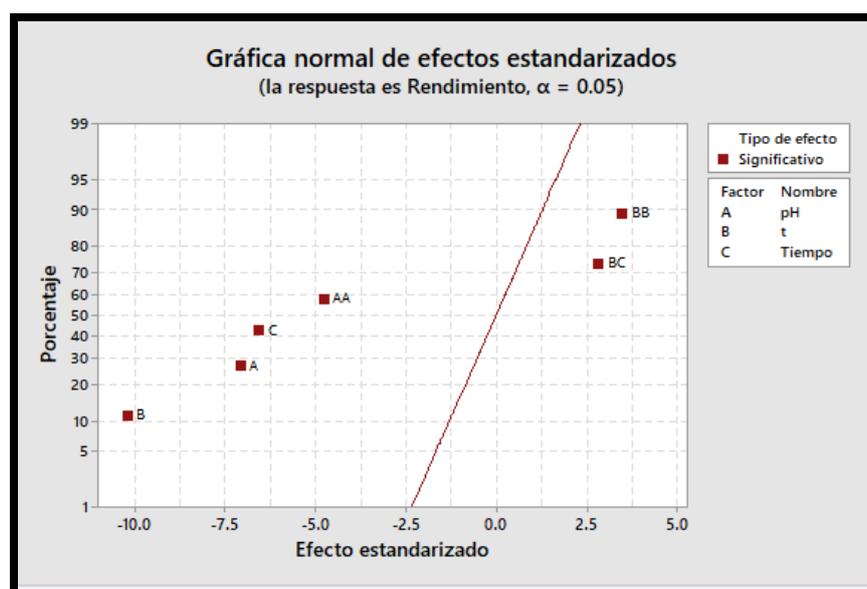


Ilustración 25. Gráfica normal de efectos estandarizados.

Fuente: Autor

La gráfica permite visualizar que los factores que se encuentran de color rojo en forma de cuadrados (BC, BB, AA, C, A, y B) son los efectos más significativos en el nivel 0.05. La gráfica de efectos normales permite identificar la dirección del efecto, por lo tanto [Ilustración 25] se puede deducir que las variables independientes tienen efectos positivos sobre la producción de etanol.

La gráfica [Ilustración 26] de probabilidad de normales absolutos de los efectos sirve para detectar la magnitud e importancia de los efectos y al igual del diagrama de Pareto muestran los valores absolutos de los efectos estandarizados (Minitab, 2019b). Semejante a la Ilustración 25, aquellos efectos que están más alejados de 0 son considerados como estadísticamente significativos. Una vez más, obtenemos que los factores BC, BB, AA, C, A, y B son los que presentan mayor efecto sobre la obtención de etanol.

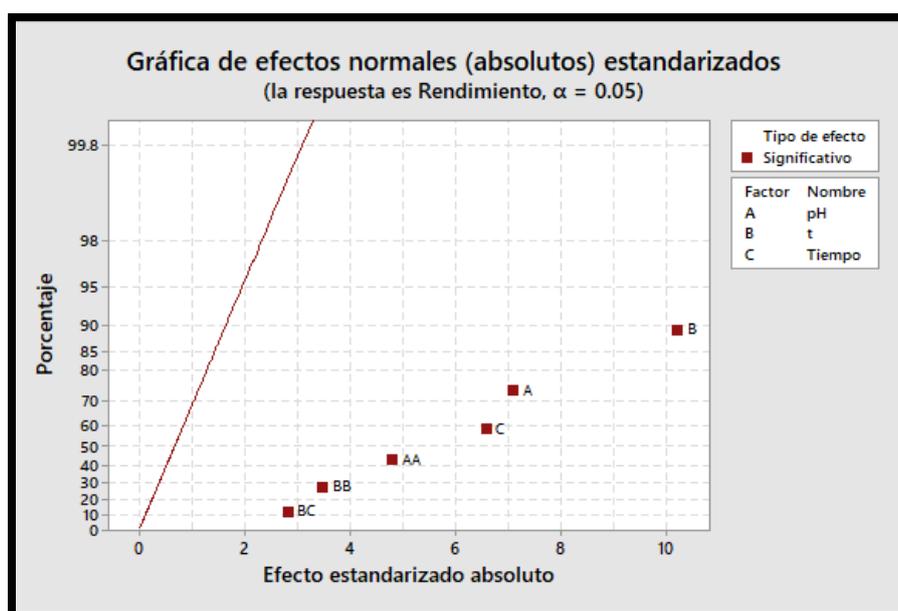


Ilustración 26. Gráfica de efectos normales absolutos estandarizados.

Fuente: Autor

La gran diferencia entre la gráfica normal de efectos estandarizados y la gráfica de efectos normales absolutos, está en que la primera expone tanto los efectos positivos como los negativos, en este caso no hubo efectos negativos, pero cuando si los hay resulta dificultoso determinar cuáles de los efectos cambien en mayor medida la respuesta.

Las gráficas de efectos principales [Ilustración 27] utilizan las medias de respuesta para cada nivel de factor conectado por una línea. Si la línea tiene aspecto horizontal quiere decir que cada nivel del factor se ve afectado de la misma forma y la media de respuesta es la misma para todos los niveles. Cuando la línea no es horizontal, que es el caso para los factores analizados (Ph, temperatura y tiempo), entonces se puede decir que si existe un efecto principal. En cuanto mayor sea la pendiente de la línea, mayor es la magnitud del efecto principal (Minitab, 2019^a).

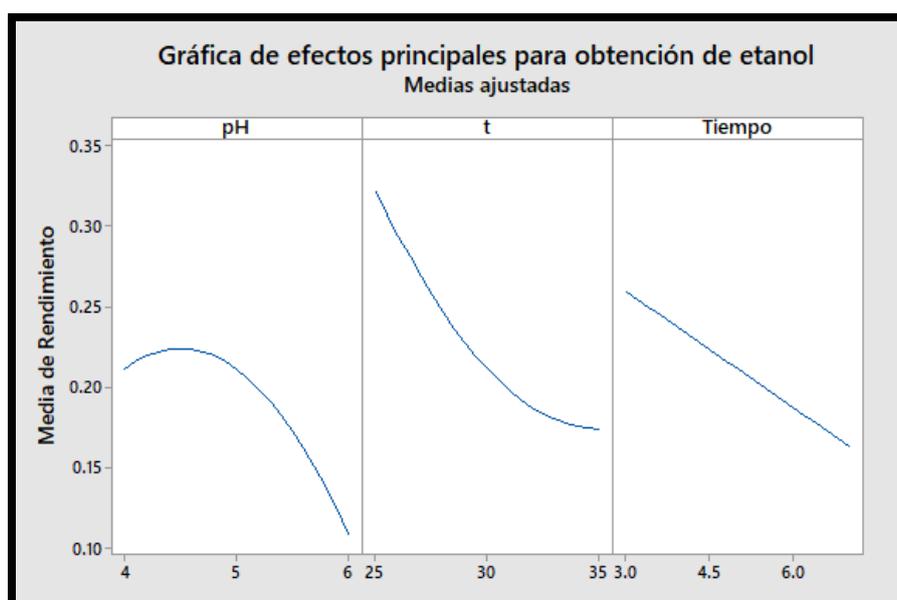


Ilustración 27. Gráfica de efectos principales: Ph, (t) temperatura, tiempo..

Fuente: Autor

Al analizar la media del factor Ph en la Ilustración 27, se puede observar que este tiene mayor rendimiento al alcanzar aproximadamente el valor de 4.5, y que a un Ph de 5-6 la tasa de producción decrece considerablemente. En cuanto a la temperatura, la media indica que existe mayor producción a 25 °C y a medida que incrementa la temperatura el rendimiento decae. En relación al factor tiempo, la media tiene un nivel

más alto a los 3 días de fermentación y por esta razón no es recomendable dejar fermentar más días ya que la producción de etanol es menor al pasar de los días.

Al comparar los resultados obtenidos en el presente estudio con otros similares se puede constatar que existe similitud en ciertos factores, como es el caso de Shet et al., (2018), en el que alcanzan una óptima fermentación del hidrolizado ácido de la cáscara de cacao a las 72 h (3 días). En cuanto a temperatura, la mayoría de investigaciones para la producción de etanol aplicando *Saccharomyces cerevisiae* han tenido éxito trabajando con un rango de 25-30 °C. Aunque vale indicar, que muchos como Phong *et al.*, (2016) y Samah, Sias, Hua, & Hussin, (2011) han alcanzado su máxima producción a 30 °C. Respecto al Ph, los mejores resultados se han obtenido al emplear un Ph ligeramente ácido. En la investigación de Ramirez, Vasco, Vélez, & Giraldo, (2013) se alcanzó el máximo rendimiento de conversión a etanol con un Ph de 4.4 que es bastante cercano al 4.5 alcanzado en el presente estudio.

La Ilustración 28, muestra las interacciones entre los factores Ph, tiempo y temperatura. Si las líneas son paralelas, es decir que no entran en contacto entre sí, no hay interacción.

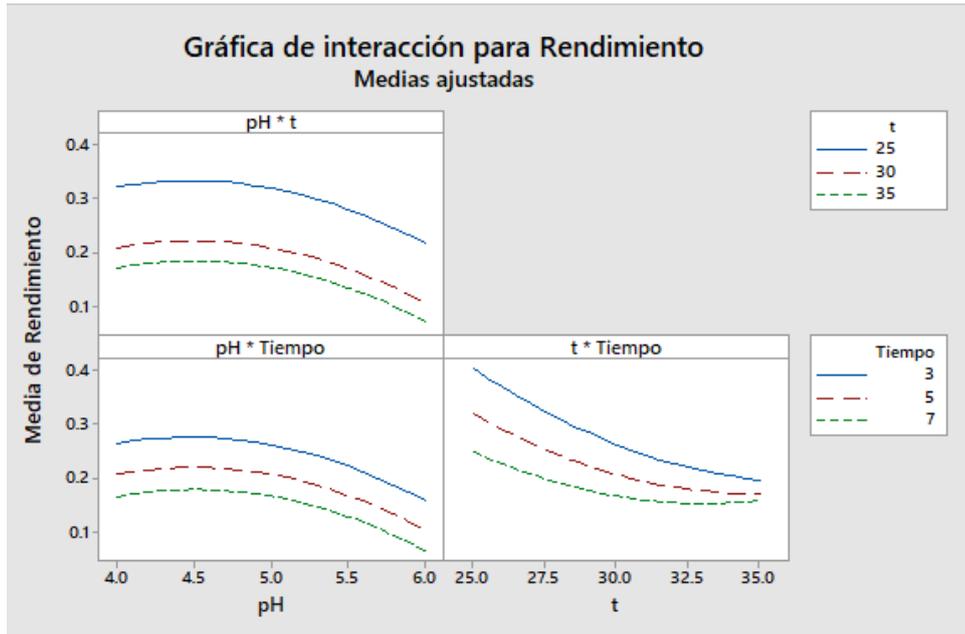


Ilustración 28. Interacciones de las variables en el diseño central compuesto.

Fuente: Autor

Por lo tanto no existe interacción entre los factores Ph*t y Ph*Tiempo. En el caso de t*Tiempo si existe interacción, entre mayor sea la diferencia en la pendiente mayor será el grado de interacción.

4.6 Optimización del proceso

La ecuación de regresión brindada por el programa indica que esta en unidades no codificadas, es decir que la superficie de respuesta no presenta curvatura por lo que se trata de una ecuación de regresión de primer orden [Tabla 14].

Tabla 14. Ecuación de regresión en unidades no codificadas

Rendimiento	
Etanol	$1.513 + 0.456 \text{ Ph} - 0.1173 \text{ t} - 0.1100 \text{ Tiempo} - 0.0508 \text{ Ph*Ph} + 0.001469 \text{ t*t} + 0.00288 \text{ t*Tiempo}$

Fuente: Autor

La gráfica de optimización de superficie de respuesta ayuda a identificar cuál de las conjugaciones experimentales interactúan efectivamente para maximizar el proceso. Es así como se identificó el Ph, tiempo y temperatura óptimos con la finalidad de determinar las condiciones de fermentación para un máximo rendimiento de etanol.

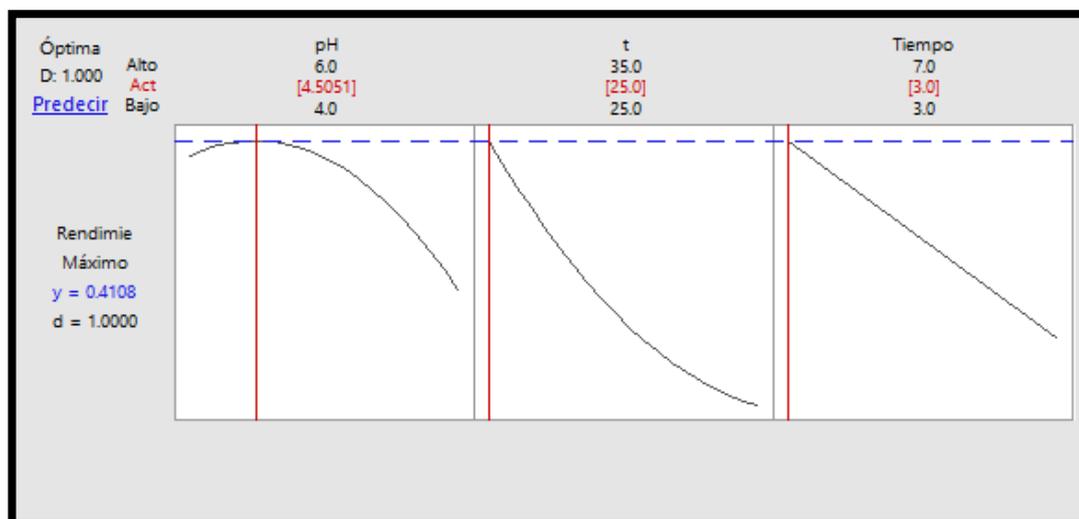


Ilustración 29. Gráfica de optimización de las variables dependientes obtenida de Minitab®: Ph, tiempo, y temperatura (t).

Fuente: Autor

El programa estadístico Minitab® calculó que el máximo rendimiento de etanol [0.41 mg/L] se obtuvo al conjugar los efectos de las siguientes tres variables estudiadas: Ph 4.5, tiempo de 3 días, y a temperatura de 25 °C.

La gráfica de superficie de respuesta [Ilustración 30] muestra una vista tridimensional de las condiciones óptimas. Permite observar las regiones con mayor rendimiento pudiendo así relacionar a las variables de tiempo y temperatura en relación a la producción de etanol.

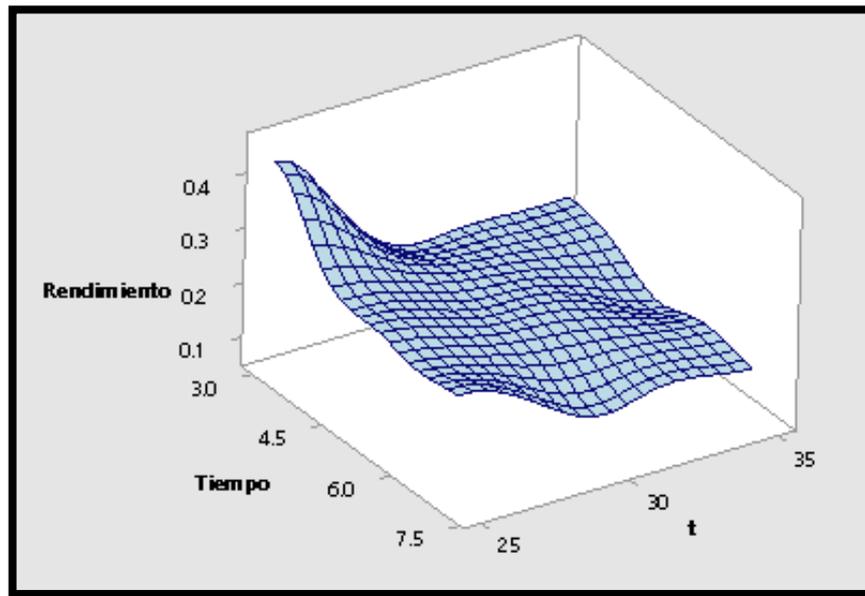


Ilustración 30. Gráfica de Superficie de Respuesta del rendimiento de etanol vs. Ph y temperatura.

Fuente: Autor

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

La cáscara de cacao, residuo de la industria cacaotera, demuestra ser una materia prima con gran potencial para la obtención de etanol de segunda generación, puesto que su composición fisicoquímica contiene buenos porcentajes de celulosa y hemicelulosa (29.07% y 2.97%).

La fermentación de los azúcares disponibles permitió obtener un rendimiento de aproximadamente 50% de etanol en la mayoría de muestras, independiente del volumen y condiciones a las que fueron sometidas.

La destilación mostro mayor volumen de etanol al fermentar bajo la siguiente conjugación de variables: pH 5, durante 3 días, y a temperatura de 25°C. El rendimiento de etanol alcanzado fue de 0.40 mg/L.

La optimización del proceso de fermentación se alcanzó con las siguientes condiciones: pH 4.5, en un periodo de 3 días, y a temperatura de 25°C. El rendimiento de etanol fue de 0.41mg/L.

La herramienta estadística RSM optimizó satisfactoriamente los factores de fermentación (temperatura, tiempo y pH). Se corroboró la eficiencia del modelo estadístico al replicar dichas condiciones en un biorreactor que alcanzó el valor optimizado [0.41 mg/L]. Los resultados indicaron que es una herramienta favorable para la producción de etanol.

Los resultados han demostrado que la cáscara de cacao es un material apto para la obtención de etanol, se recoge en condición de desecho y su constante producción hace que sea una materia prima renovable.

5.2. Recomendaciones

Al ser una material con alto porcentaje de lignina (33.90%), se recomienda aplicar pre-tratamientos que la eliminen de manera eficaz y permitan acceder rápidamente a la celulosa.

Al trabajar con cáscara de cacao, se recomienda acondicionar el tamaño de partícula con una malla de 80 (0.22 mm).

Se recomienda cambiar el tipo de hidrólisis por una enzimática, ya que ayudaría a reducir; costos, generación de residuos tóxicos y formación de reacciones que interfieren en el proceso.

Similar a lo sugerido anteriormente, se recomienda que en una próxima investigación, se realice la optimización del proceso de hidrólisis poniendo a prueba variables como; tiempo de hidrólisis, cantidad de cáscara, temperatura, entre otros.

Con respecto a la optimización del proceso de fermentación, se sugiere emplear otra variedad de levadura similar a la *Saccharomyces cerevisiae*, para estudiar que efecto tendría sobre la producción de etanol.

BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, D., Martínez, R., Muñoz, J. J., Torres, M. P., & Vargas, G. (2010). Residuos de café, cacao y cladodio de tuna: fuentes promisorias de fibra dietaria. *Revista Tecnológica ESPOL-RTE*, 23(2), 63–69. Retrieved from <https://bit.ly/3c0ObDI>
- Aguilar, N. (2010). Modelo cinético de la hidrólisis del residuo de cosecha cañero. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 20(2), 5–18.
- Álvarez-León, R., & Ortiz-Valbuena, K. (2015). Efecto del vertimiento de subproductos del beneficio de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre algunas propiedades químicas y biológicas en los suelos de una finca cacaotera, municipio de Yaguará (Huila, Colombia). *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. U. de Caldas*, 19(1), 65-84. <https://doi.org/10.17151/bccm.2015.19.1.5>
- Álvarez, C. (2009). *Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional*. *Economía Informa*. (Tesis de posgrado). Universidad Nacional Autónoma de Mexico (UNAM).
- Álvarez, G., Bell, A., Ramil-Mesa, M., & Viñas, M. (2012). Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulosica. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 46(1), 7–16. Retrieved from <https://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=223123848002>
- Alvarez, S., Evelson, P., & Boveris, A. (2008). Etanol : El combustible del futuro. *Encrucijadas*, (45). Retrieved from http://repositorioubasibsi.uba.ar/gsd/collect/encrucci/index/assoc/HWA_280.dir/280.PDF
- Awolu, O., & Oyeyemi, S. O. (2015). Optimization of Bioethanol production from

- Cocoa (Theobroma cacao) Bean Shell. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 4(4), 506–514. Retrieved from <http://www.ijcmas.com>
- Ballesteros, M, Ballesteros, I, Oliva, J. M., & Navarro, A. A. (1998). *Biocombustibles Líquidos: Aceites Vegetales y Bioetanol*. España. [https://doi.org/ISSN 1135'9429](https://doi.org/ISSN%201135%279429)
- Ballesteros, Mercedes. (2008). Biocarburantes de segunda generación. *Ecología Política*, 34, 11–13. Retrieved from <https://bit.ly/2X77SFe>
- Benalcazar, J. C. (2018). *Evaluación de diferentes pretratamientos químicos a la biomasa de la cáscara de cacao para procesos de fermentación alcohólica Proyecto de investigación*. (Tesis de pregrado). Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador.
- Calderón, M. D. (2016). Biocombustibles: las dos caras de la moneda. *Revista de Divulgación Científica Facultad de Ciencias Agrarias - UNCuyo*, (5). [https://doi.org/ISSN 2422-6254](https://doi.org/ISSN%202422-6254)
- Cardona, C. A., & Orrego, C. E. (2009). *Avances investigativos en la producción de biocombustibles*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia - Sede Manizales, Manizales, Colombia. ISBN 978-958-44-5261-0. <https://doi.org/978-958-44-5261-0>
- Castro, C., Beltrán, L., & Ortiz, J. (2012). Producción de biodiesel y bioetanol: ¿Una alternativa sustentable a la crisis energética? *Ra Ximhai*, 8(3b, septiembre-diciembre), 93–100. <https://doi.org/ISSN:1665-0441>
- Cavieres, P. (2008). Biocombustibles de Primera Generación. *Revista ElectroIndustria*. Retrieved from <http://www.emb.cl/electroindustria/articulo.mvc?xid=959>
- Concha, W. (2014). *Producción biológica de ácido cítrico a partir del lactosuero de*

residuo quesero entero y deproteinizado utilizando una cepa fungal de Aspergillus niger sp. en cultivo sumergido. Universidad Católica de Santa María.

- Corredor, Y. A. V., & Pérez, L. I. P. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.18359/RFCB.3108>
- Cortes, W. (2011). Materiales lignocelulosicos como fuente de biocombustibles y productos químicos. *Ciencia y Tecnología Aeronáutica*, 16(12), 41–46.
- Cortes, W. (2014). Tratamientos Aplicables a Materiales Lignocelulósicos para la Obtención de Etanol y Productos Químicos. *Revista de Tecnología*, 13, 39–44. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6041572>
- Cuervo, L., Folch, J., & Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Bio Tecnología*, 13(3), 11–25. Retrieved from http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Lignocelulosa.pdf
- Daniel, I., De Los Ríos, L., Fabián, O., Cobos, H., Carlos, ;, & Moreno Téllez, M. (2012). Corrosion evaluation of materials used in motorcycles tanks in contact with gasoline and ethanol mixtures. *Rev.Ion*, 53–57. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rion/v25nspe/v25nspea08.pdf>
- De la Cruz, J., Vargas, A., & Del Angel, O. (2011). CACAO: Operaciones Poscosecha. In AGST/FAO (Ed.), *INPhO Compendio de Poscosecha* (p. 77). México : FAO. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-au995s.pdf>
- Delgado, J., Soler, J., & Peña, J. Á. (2018). Optimización de la producción de bioetanol en procesos fermentativos del mucílago de Cacao CCN – 51 en un biorreactor tipo batch. *Jornada de Jóvenes Investigadores Del I3A*, 6(8 de junio), 8–10.

<https://doi.org/ISSN: 2341-4790>

- Delius, C. E. (2008). Producción de etanol: Una oportunidad para Bolivia. *Revista Virtual REDESMA [Online]*, 2(1), 57–68. Retrieved from <https://bit.ly/39CRBdP>
- El telégrafo. (2013). Gasolina Ecopaís ahorró en 3 años 14 millones de dólares al Estado. Retrieved from <https://www.letelegrafo.com.ec/noticias/economia/8/80-mil-hectareas-de-cana-para-producir-biocombustibles>
- Escalante, J., & Fuentes, H. (2013). *Estudio experimental de obtención de bioetanol a partir de residuos agrícolas de banano orgánico en Piura*. (Tesis de pregrado). Universidad de Piura, Piura, Perú.
- Faba, L., Díaz, E., & Ordóñez, S. (2014). Transformación de biomasa en biocombustibles de segunda generación. *Madera y Bosques*, 20(3), 11–24. Retrieved from <https://bit.ly/39REZPO>
- FAO. (2008). Biocombustibles: perspectivas, riesgos y oportunidades. In *FAO Perspectivas Agrícolas* (pp. 3–113). Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura. Retrieved from <http://www.fao.org/3/i0100s/i0100s.pdf>
- Guarnizo, A., Martínez, P. N., & Valencia, H. A. (2009). Pretratamientos de la celulosa y biomasa para la sacarificación. *Scientia Et Technica*, 589(42), 284–289. Retrieved from http://fjartnmusic.com/Personal/8o_Semestre_files/BioEtOH.pdf
- IICA. (2007a). *Atlas de la agroenergía y los biocombustibles en las Américas: i.etanol*. San José, Costa Rica : Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Retrieved from www.iica.int
- IICA. (2007b). Preguntas y respuestas más frecuentes sobre biocombustibles. Retrieved

October 9, 2019, from <https://bit.ly/2JKukvJ>

- ILAC. (2018). *Observatorio del Cacao Fino y de Aroma para América Latina. Iniciativa Latinoamericana del Cacao*. Retrieved from http://scioteca.caf.com/bitstream/handle/123456789/1258/OLC_CAF_boletin_3_Español-final.pdf
- IMP. (2017). *Reporte de inteligencia tecnológica "Bioetanol."* México. Retrieved from <https://bit.ly/2wm7FTw>
- Jaramillo, O. (2013). *Hidrólisis ácida de materiales lignocelulósicos y detoxificación por pervaporación*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Colombia.
- Lenin, H., & Oscullo, J. (2016). Factor Anual de Emisión de CO₂ Producido por el Parque Generador del Sistema Nacional Interconectado del Ecuador, Mediante la Aplicación de la Metodología de la Convención Marco Sobre el Cambio Climático UNFCCC, para el Periodo 2009-2014. *Revista Politécnica*, 37(1). Retrieved from http://www.revistapolitecnica.epn.edu.ec/images/revista/volumen37/tomo1/Factor_Anuar_de_Emision.pdf
- Líderes. (2015). El mercado se adecúa a la gasolina Ecopaís. *El Comercio*. Retrieved from <https://www.revistalideres.ec/lideres/mercado-gasolina-ecopais-ecuador.html>
- Loyo, E. S. (2015). *Exportación de casacaras, películas y demás residuos de cacao hacia Perú, año 2015*. (Tesis de pregrado). Universidad de Las Americas, Perú.
- Martínez-Ángel, J., Ortíz-Rodríguez, O., & Villamizar-Gallardo, R. (2015). Caracterización y evaluación de la cáscara de mazorca de cacao (*Theobroma cacao*)

- L.) como fuente de energía renovable. *Agrociencia*, (49), 329–345.
<https://doi.org/329345>
- Mbajiuka, Chinedu, S., Ifediora, A. ., Onwuakor, C. ., & Nwokoji, L. . (2015). Fermentation of Pods of Cocoa (*Theobroma cacao* L) Using Palm Wine Yeasts for the Production of Alcohol and Biomass. *American Journal of Microbiological Research*, 3(2), 80–84. <https://doi.org/10.12691/ajmr-3-2-7>
- Medina, J. J. (2008). *Principales insumos en la producción de combustibles. Estudio Exploratorio*. Buenos Aires, Argentina. Retrieved from <https://bit.ly/3bS0Isy>
- Miftahul, A., & Asip, F. (2015). Bioethanol Production from Coconut Fiber Using Alkaline Pretreatment and Acid Hydrolysis Method. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 5(5), 320. Retrieved from <https://bit.ly/2X8E4rQ>
- Minitab, L. (2019a). ¿Qué es una gráfica de efectos principales? Retrieved February 18, 2020, from <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/supporting-topics/basics/what-is-a-main-effects-plot/>
- Minitab, L. (2019b). Gráficas de efectos para analizar diseño de superficie de respuesta. Technical Support by Minitab® 18.
- Mosquera, J. D., Fernandez, S., & Mosquera, J. C. (2010). Análisis De Emisiones De Co2 Para Diferentes Combustibles En La Poblacion De Taxis En Pereira Y Dosquebradas. *Scientia Et Technica*, 16(45), 141–146.
<https://doi.org/10.22517/23447214.385>
- National Geographic. (2010). Biocombustibles. Retrieved May 29, 2019, from

<https://www.nationalgeographic.es/video/tv/esta-isla-remota-esta-cubierta-por-38-millones-de-pedazos-de-plastico>

- Nazir, N., Novelina, Juita, E., Amelia, C., & Fatli, R. (2016). Optimization of pre-treatment process of cocoa pod husk using various chemical solvents. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 6(3), 403–409. <https://doi.org/10.18517/ijaseit.6.3.848>
- OCDE/FAO. (2017). Biocombustibles. In *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2017-2026* (pp. 1–10). París: OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/agr-data-en>
- Pacheco, M. (2019). La compra de etanol local para producir la ecopaís se retoma. *El Comercio*. Retrieved from <https://www.elcomercio.com/actualidad/etanol-ecopais-ministerio-energia-biocombustible.html>
- Peláes, R. A., & Palma, Í. J. P. (2011). *Diseño de planta para la obtención de bioetanol anhidro a partir de las mieles agotadas de la caña de azúcar*. (tesis de grado). Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.
- Peña, C., & Arango, R. (2009). Evaluación de la producción de etanol utilizando cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de melaza de caña de azúcar. *Año*, 76(159), 153–161.
- Phong, H. X., Quan, P. T., Thanh, N. N., & Dung, N. T. P. (2016). Study on fermentation conditions for bioethanol production from cocoa pod hydrolysate. *Can Tho University Journal of Science*, (Special Issue: Renewable Energy), 1–6. <https://doi.org/10.22144/ctu.jsi.2016.001>
- Ramirez, M., Vasco, O., Vélez, Y., & Giraldo, M. (2013). Producción de bioetanol empleando fermentación tradicional y extractiva a partir de jugo de fique. *Hechos*

Microbiológicos, 4(2), 91–07.

Revista Química. (2013). Preguntas y respuestas sobre los combustibles. *Revista Química de Industria & Minería*. Retrieved from <http://www.revistaquimica.cl/?p=1990>

RFA. (2017). Características físicas y químicas del etanol y combustibles de hidrocarburos.

Rico, J. (2009). *Biocarburantes en el transporte*. Madrid, España. Retrieved from <http://biblioteca.climantica.org/resources/26/guia-seerrbiocarburantes-07.pdf>

Ríos, L. A. (2015). Producción de bioetanol a partir de jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) respecto a otros materiales lignocelulósicos. *Revista Agunkuya*, 2(1), 42–62. Retrieved from <http://revia.areandina.edu.co/ojs/index.php/Cc/article/view/302>

Salas, J., & Yunuen, L. (2015). Cacao, una aportación de México al mundo. *Revista Ciencia, julio-septiembre*, 32–39.

Salinas, E., & Gasca, V. (2009). Los biocombustibles. *El Cotidiano*, (157), 75-82. ISSN: 0186-1840. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=32512739009>

Samah, O. A., Sias, S., Hua, Y. G., & Hussin, N. N. (2011). Production of ethanol from cocoa pod hydrolysate. *ITB Journal of Science*, 43 A(2), 87–94. <https://doi.org/10.5614/itbj.sci.2011.43.2.2>

Sánchez, J., Soler, J., & Herguido, J. (2018). Hidrólisis ácida de cáscaras de vaina de cacao CCN-51. Optimización del proceso para generación de azúcares reductores. *Jornada de Jóvenes Investigadores Del I3A*, 6(8 de junio). Retrieved from

<https://bit.ly/2JD16Pr>

Sanchez Riaño, A. M., Gutiérrez Morales, A. I., Muñoz Hernández, J. A., & Rivera Barrero, C. A. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Tumbaga*, 1(5), 61–91. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3628225>

Sanderson, K. (2012). Biocombustibles de segunda generación. *Investigación y Ciencia [Online]*. Retrieved from <https://bit.ly/34lg5a8>

Serna, F., Barrera, L., & Montiel, H. (2011). Impacto Social y Económico en el Uso de Biocombustibles. *J. Technol. Manag. Innov*, 6(1). Retrieved from <http://www.jotmi.org>

Shet, V. B., sanil, N., Bhat, M., Naik, M., Mascarenhas, L. N., Goveas, L. C., ... Aparna, A. (2018). Acid hydrolysis optimization of cocoa pod shell using response surface methodology approach toward ethanol production. *Agriculture and Natural Resources*, 52(6), 581–587. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.11.022>

Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 50(1), 20–28. <https://doi.org/ISSN 0138-6204>

Torres, M. A. (2019). *Obtención de celulosa a partir de la cáscara de cacao ecuatoriano (Theobroma cacao L.) mediante hidrólisis térmica para la elaboración de pulpa de papel*. Universidad Central del Ecuador .

Torres, Y. J. (2016). *Caracterización de Biomasa Lignocelulósica (Thebroma Cacao L) para uso en la obtención de etanol por vía fermentativa*. (tesis de pregrado).

Universidad Santo Tomás, Bucaramanga, Colombia.

UNESCO. (2008). La Ruta del Cacao en América Latina y el Caribe. Diversidad Cultural Hacia un Desarrollo Endógeno. Retrieved January 20, 2020, from http://www.lacult.unesco.org/cacao/menu_produccion.php?uid_ext=&getipr=&lg=1&id=&ppage=3

Unión Europea. (2017). *Análisis panorámico: Acción de la UE en materia de energía y cambio climático*. Luxemburgo. <https://doi.org/10.2865/98618>

Urgilés, L., & Erreyes, J. (2018). *Análisis de la influencia del combustible Ecopaís en emisiones contaminantes y prestaciones de un vehículo Chevrolet Gran Vitara como prototipo en la ciudad de Cuenca*. (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana Cuenca, Ecuador.

Vázquez, H., & Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 8(4), 249–259. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-77432007000400004

Villagómez, S., & Argüello, F. (2013). Optimización Y Aprovechamiento Del Residuo (Exudado Del Mucílago) De La Almendra Fresca Del Cacao (Theobroma Cacao L.) Ccn51 En La Elaboración De Vinagre. *Tsafiqui - Revista de Investigación Científica UTE*, (4), 7. <https://doi.org/10.29019/tsafiqui.v0i4.256>

Villamizar, Y. L., Rodríguez, J. S., & León, L. C. (2017). Caracterización fisicoquímica, microbiológica y funcional de harina de cáscara de cacao (Theobroma cacao L.) variedad CCN-51. 1 δ Characterization physicochemical, microbiological and

functional of cacao shell flour (*Theobroma cacao* L .) variety CCN. *Cuaderno Activa*, (9), 65–75.

Viñals, M., Bell, A., Michelena, G., & Ramil, M. (2012). Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 46(01386204), 7–16. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223123848002>

ANEXOS

Anexo 1. Resultados de análisis bromatológico de la cáscara de cacao.

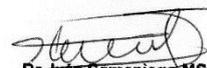
MC-LSAIA-2201-04

	INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS ESTACION EXPERIMENTAL SANTA CATALINA DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y CALIDAD LABORATORIO DE SERVICIO DE ANALISIS E INVESTIGACION EN ALIMENTOS <small>Panamericana Sur Km. 1. CutugueguaTifs. 2690691-3007134. Fax 3007134</small> <small>Casilla postal 17-01-340</small>	
---	---	---

NOMBRE PETICIONARIO: Srta. Kelly Noemy Loayza Calva DIRECCION: La Cuca, Arenillas El-Oro FECHA DE EMISION: 31 de Mayo del 2019 FECHA DE ANALISIS: Del 27 al 31 de Mayo del 2019	INFORME DE ENSAYO No: 178 INSTITUCION: ATENCION: FECHA DE RECEPCION.: HORA DE RECEPCION: ANALISIS SOLICITADO	Universidad Politécnica Salesiana Srta. Kelly Noemy Loayza Calva 27 de Mayo del 2019 13h:45 Van Soests, Humedad, Cenizas, Proteína
--	---	--

ANÁLISIS	HUMEDAD	CENIZAS ^Ω	PROTEÍNA ^Ω				IDENTIFICACIÓN
MÉTODO	MO-LSAIA-01.01	MO-LSAIA-01.02	MO-LSAIA-01.03				
METODO REF.	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970				
UNIDAD	%	%	%				
19-0650	8,22	12,04	5,93				Cáscara de Cacao (Theobroma Cacao)
ANÁLISIS		F.D.N. ^Ω	F.D.A. ^Ω	LIGNINA ^Ω			
MÉTODO		MO-LSAIA-02.01	MO-LSAIA-02.02	MO-LSAIA-02.03			
METODO REF.		U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970			
UNIDAD		%	%	%			
19-0650		65,74	62,97	33,90			Cáscara de Cacao (Theobroma Cacao)
ANÁLISIS		CELULOSA ^Ω	HEMICELULOSA ^Ω				
MÉTODO		MO-LSAIA-0202	MO-LSAIA-0201				
METODO REF.		U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970				
UNIDAD		%	%				
10-0650		29,07	2,97				Cáscara de Cacao (Theobroma Cacao)

Los ensayos marcados con Ω se reportan en base seca.
 OBSERVACIONES: Muestra entregada por el cliente

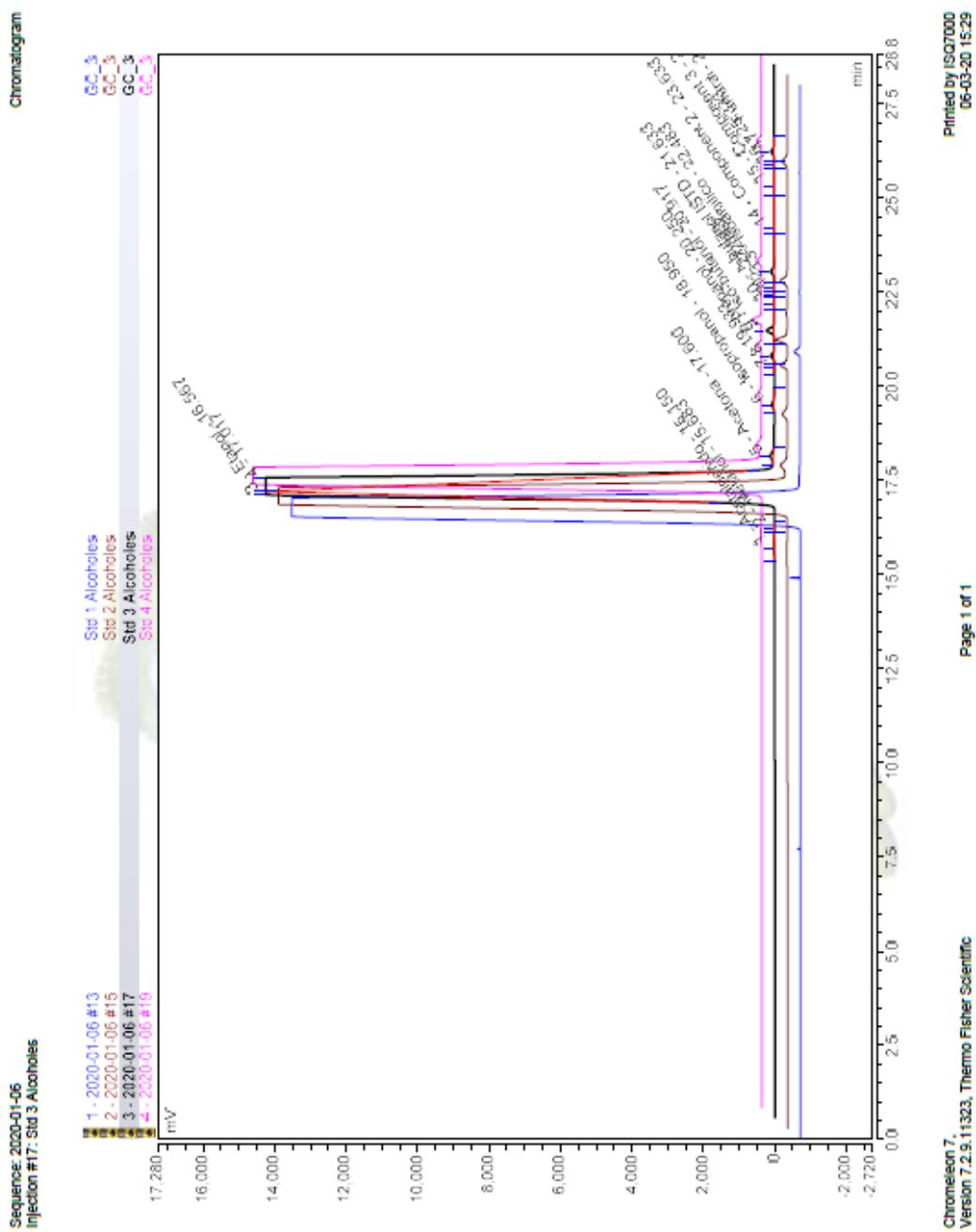
 Dr. Ivan Samaniego MSc. RESPONSABLE TÉCNICO	RESPONSABLES DEL INFORME 	 Ing. Bladimir Ortiz RESPONSABLE DE CALIDAD
---	--	---

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.
 Los resultados arriba indicados solo están relacionados con el objeto de ensayo
 NOTA DE DESCARGO: La información contenida en este informe de ensayo es de carácter confidencial, está dirigido únicamente al destinatario de la misma y solo podrá ser usada por este. Si el lector de este correo electrónico o fax no es el destinatario del mismo, se le notifica que cualquier copia o distribución de este se encuentra totalmente prohibido. Si usted ha recibido este informe de ensayo por error, por favor notifique inmediatamente al remitente por este mismo medio y elimine la información.

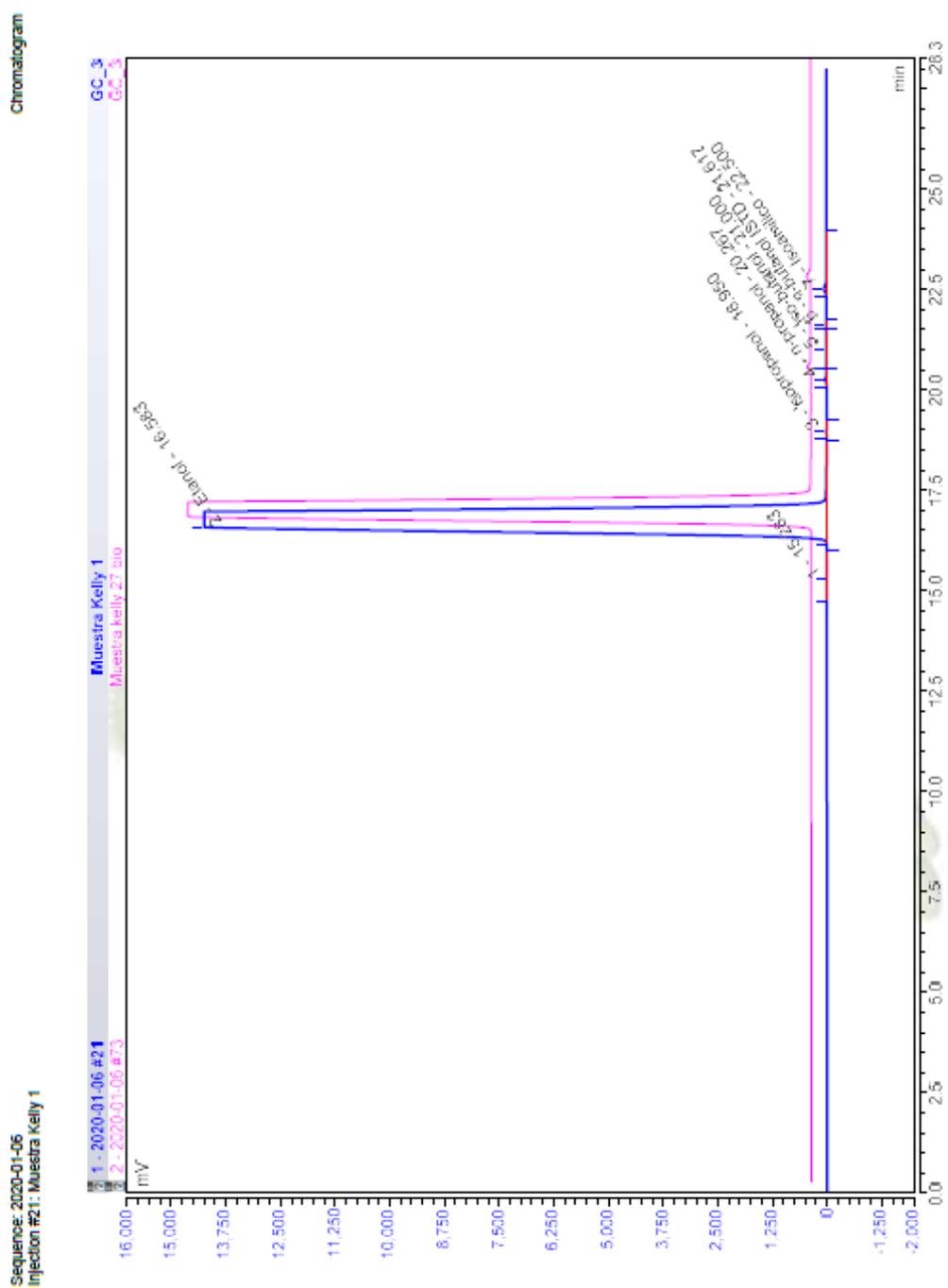
Anexo 2. Resultados de azúcares reductores en cada muestra (Fehling A y Fehling B).

Temperatura	pH	Tiempo	Solución sacarificada gastada (mL)	g de azúcares reductores totales en cada muestra g/mL
25	4	5	5.0	2.85
25	5	3	5.0	2.85
25	5	7	5.3	2.69
25	6	5	5.0	2.85
30	5	5	5.2	2.74
30	5	5	5.1	2.79
30	4	7	5.5	2.59
30	5	5	5.3	2.69
30	6	3	5.5	2.59
30	6	7	5.0	2.85
30	4	3	5.1	2.79
35	5	7	5.4	2.64
35	5	3	5.3	2.69
35	6	5	5.2	2.74
35	4	5	5.0	2.85

Anexo 3. Cromatograma: curva de calibración.



Anexo 4. Cromatograma: Muestra optimizada (azul), muestra biorreactor (Fucsia).



Anexo 5. Promedio de los resultados de fermentación.

# Muestra	Rep.	pH	Temperatura	Tiempo (días)	mL dest.	mg%	Grado alcoholico	mL etanol	Rendimiento mL/g
1	1	6	35	5	2	77980.209	49.73	0.99	0.07
2	1	4	35	5	5	77973.6498	49.72	2.49	0.17
3	1	5	30	5	6	77905.6234	49.68	2.98	0.20
4	1	5	25	3	12	77990.0379	49.73	5.97	0.40
5	1	4	25	5	10	77006.9245	49.11	4.91	0.33
6	1	4	30	3	7	77945.9645	49.71	3.48	0.23
7	1	5	35	7	3	77940.5855	49.70	1.49	0.10
8	1	6	30	7	2	77929.2925	49.70	0.99	0.07
9	1	6	25	5	7	77905.3482	49.68	3.48	0.23
10	1	5	25	7	8	78044.2099	49.77	3.98	0.27
11	1	5	30	5	5.5	77905.6234	49.68	2.73	0.18
12	1	5	30	5	6	77789.8224	49.61	2.98	0.20
13	1	6	30	3	4	77964.7301	49.72	1.99	0.13
14	1	5	35	3	5	77849.6444	49.64	2.48	0.17
15	1	4	30	7	6	78003.0246	49.74	2.98	0.20
16	2	6	35	5	2.5	76785.6158	48.97	1.22	0.08
17	2	4	35	5	6	77701.1862	49.55	2.97	0.20
18	2	5	30	5	7	77674.0214	49.53	3.47	0.23
19	2	5	25	3	13.5	78140.5073	49.83	6.73	0.45
20	2	4	25	5	9	77974.7993	49.72	4.48	0.30
21	2	4	30	3	8	77905.7493	49.68	3.97	0.26
22	2	5	35	7	5	77989.3817	49.73	2.49	0.17
23	2	6	30	7	3	77794.2692	49.61	1.49	0.10
24	2	6	25	5	5	77961.9087	49.72	2.49	0.17
25	2	5	25	7	6.5	77893.471	49.67	3.23	0.22
26	2	5	30	5	6	77789.8224	49.61	2.98	0.20
27	2	5	30	5	7	77674.0214	49.53	3.47	0.23
28	2	6	30	3	5	77881.9758	49.67	2.48	0.17
29	2	5	35	3	7	77870.5004	49.66	3.48	0.23
30	2	4	30	7	4.5	77885.2799	49.67	2.24	0.15
biorreactor		4.5	25	3	163	78112.5929	49.81	82.19	0.41