

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y CONCENTRACIÓN DE
ÁCIDO SULFÚRICO EN LA HIDRÓLISIS ÁCIDA DE RAQUIS DEL
BANANO, VARIEDAD *Musa cavendish*, PARA LA OBTENCIÓN DE
BIOETANOL POR *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

Bach. Melgarejo Torres Lady Katherine

Bach. Urquiza Rosado Angela Celeste

ASESOR

M. Sc. Ángel Castro Alvarado

NUEVO CHIMBOTE – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y CONCENTRACIÓN DE
ÁCIDO SULFÚRICO EN LA HIDRÓLISIS ÁCIDA DE RAQUIS DEL
BANANO, VARIEDAD *Musa cavendish*, PARA LA OBTENCIÓN DE
BIOETANOL POR *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

Revisado y Aprobado por el Asesor

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Ángel Castro Alvarado", is written over a horizontal line.

M. Sc. Ángel Castro Alvarado

ASESOR

NUEVO CHIMBOTE – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y CONCENTRACIÓN DE
ÁCIDO SULFÚRICO EN LA HIDRÓLISIS ÁCIDA DE RAQUIS DEL
BANANO, VARIEDAD *Musa cavendish*, PARA LA OBTENCIÓN DE
BIOETANOL POR *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

APROBADO POR EL JURADO CALIFICADOR INTEGRADO POR LOS
SEÑORES MIEMBROS

Dr. ROBERTO VEGA PAULINO
PRESIDENTE

M. Sc. ÁNGEL CASTRO ALVARADO
SECRETARIO

Mblgo. ETERIO ALVA MUÑOZ
INTEGRANTE

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el AUDITORIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS, siendo las 1:45 pm horas del día 02 de junio de 2019, dando cumplimiento a la Resolución N° 095-2019-UNS-FC, se reunió el Jurado Evaluador presidido por Dr. ROBERTO VEGA PAULINO, teniendo como miembros a M.Sc. ANGEL CASTRO ALVARADO (secretario) (a), y Blgo MEdlgo Eterio Alva Muñoz (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de LICENCIADO EN BIOTECNOLOGIA realizado por el, (la), (los) tesista (as) URQUIZO ROSADO ANGELA CELESTE Y MELGAREJO TORRES LADY KATHERINE, quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada: INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO SULFÚRICO EN LA HIDRÓLISIS ÁCIDA DE RAQUIS DEL BANANO, VARIEDAD MUSA CAVENDISH, PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL POR SACCHAROMYCES CEREVISIAE ATCC 4126.

Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como BUENO asignándole un calificativo de 25 puntos, según artículo 103° del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional del Santa, vigente (Resolución N° 492-2017-CU.-R-UNS)

Siendo las 13:53 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad


Nombre: ROBERTO VEGA PAULINO
Presidente


Nombre: Angel Castro A
Secretario


Nombre: ETERIO ALVA MUÑOZ
Integrante

Distribución: Integrantes J.E (), tesistas () y archivo (02).





Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: **Melgarejo Torres Lady Katherine U...**
Título del ejercicio: **BIOTECNOLOGÍA**
Título de la entrega: **INFLUENCIA DE LA TEMPERATUR...**
Nombre del archivo: **Tamaño del archivo:13.71M**
Total páginas: **101**
Total de palabras: **19,716**
Total de caracteres: **106,522**
Fecha de entrega: **27-jun-2019 11:53a.m. (UTC-0500)**
Identificador de la entrega: **1147496519**

ENTIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



INSTITUTO DE LA INVESTIGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE
MUSEO MILITARIO EN LA HISTORIA ALBA DE RANCHO DEL
SANTO. YAREMBAHUA VILLACAMA, PARA LA OBTENCIÓN DE
DIPLOMADE BACHILLER EN BIODIVERSIDAD (FIC 40)

TRABAJO DE TÍTULO DE LA OBTENCIÓN DE
DIPLOMA EN BIODIVERSIDAD

PRESENTE
Msc. Melgarejo Torres Lady Katherine
Msc. Espinoza Rosendo Angélica Estela
UNMSM
C. de Ingeniería Química
MAYO 2019 - 101

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional del Santa, y a nuestra Escuela Académico Profesional de Biotecnología, que nos brindó la oportunidad de tener un futuro mejor, otorgándonos la posibilidad de aprender y crecer profesionalmente.

A nuestros docentes, por su incondicional apoyo, por su dedicación, enseñanzas y valores, que nos entregaron en toda nuestra formación como futuros biotecnólogos.

A los técnicos encargados de los laboratorios de investigación de la escuela académica profesional de Biotecnología que fueron parte y colaboraron en la realización de este presente trabajo de investigación.

A nuestro asesor, M. Sc. Ángel Castro Alvarado por su gran apoyo y dedicación constante en el desarrollo de nuestro trabajo de investigación.

Gracias a nuestro Dios y nuestras familias.

ANGELA Y LADY

DEDICATORIA

A Dios, por guiarnos y darnos la oportunidad de seguir adelante brindándonos vida y salud durante toda nuestra carrera profesional.

A nuestros padres por su amor, su dedicación y sacrificios en todo el tiempo. Por entregarnos su amor incondicional y esfuerzo todos los días hasta hoy.

A todos nuestros familiares que nos brindaron su apoyo para obtener nuestros objetivos trazados en esta etapa profesional.

ANGELA Y LADY

INDICE

AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
INDICE.....	viii
INDICE DE FIGURAS	xii
INDICE DE TABLAS	xiii
INDICE DE ANEXOS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. OBJETIVOS	6
1.1.1. Objetivo general.....	6
1.1.2. Objetivos específicos	6
1.2. HIPÓTESIS:.....	6
II. MARCO TEÓRICO	7
2.1. MATERIA PRIMA.....	7
2.1.1. Raquis de banano	7
2.1.2. Composición química del raquis de banano	7
2.1.3. Variedades de banano	8
2.1.4. Situación del cultivo de banano	9
2.1.5. Aprovechamiento tradicional del raquis	10
2.2. ESTUDIO DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	11
2.2.1. Definición de material lignocelulósico	11
2.2.2. Composición del material lignocelulósico.....	12
2.2.3. Lignocelulosa en la industria de biocombustibles	13
2.3. PRETRATAMIENTO DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.....	14
2.3.1. Hidrólisis ácida	16

2.4.	FERMENTACIÓN	18
2.4.1.	Microorganismos fermentativos	19
2.4.2.	Factores que intervienen en la fermentación alcoholica.....	20
2.5.	DESTILACIÓN	21
2.5.1.	Destilación sencilla	21
2.5.2.	Destilación fraccionada.....	21
2.5.3.	Destilación al vacío.....	22
2.6.	DETERMINACIÓN DE ETANOL	23
2.6.1.	Medición de la densidad utilizando un hidrómetro	23
2.6.2.	Medición de la densidad utilizando un alcoholímetro	23
2.6.3.	Medición del punto de ebullición	23
2.6.4.	Medición por el método de Refractometría	23
2.6.5.	Medición por el método cromatográfico	24
2.6.6.	Medición por el método enzimático	24
2.7.	ETANOL COMO BIOCOMBUSTIBLE.....	25
2.7.1.	Características generales del etanol	25
2.7.2.	Aplicaciones del etanol	25
2.7.3.	Bioetanol de segunda generación	25
2.7.4.	Ventajas de bioetanol de segunda generación	26
III.	MATERIALES Y METODOS	27
3.1.	DISEÑO EXPERIMENTAL	27
3.2.	POBLACIÓN Y MUESTRA	29
3.2.1.	Población	29
3.2.2.	Muestra	29
3.2.3.	Unidad de análisis	29
3.2.4.	Material biológico.....	29
3.3.	CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL.....	30

3.3.1.	Determinación de porcentaje de humedad y porcentaje de materia seca .	30
3.3.2.	Porcentaje de celulosa.....	30
3.3.3.	Porcentaje de lignina.....	30
3.3.4.	Porcentaje de ceniza.....	30
3.4.	ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA	31
3.5.	PRETRATAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA	32
3.5.1.	Hidrólisis ácida diluida	32
3.6.	DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES MEDIANTE EL METODO DE MILLER	34
3.6.1.	Preparación de la curva de calibración de azúcares reductores	34
3.6.2.	Concentraciones de azúcares reductores de la muestra hidrolizada	34
3.7.	DETERMINACIÓN DEL GLUCOSA POR KIT ENZIMATICO	35
3.7.1.	Preparación de la curva de calibración de glucosa	35
3.7.2.	Determinación de las concentraciones de glucosa de los diferentes tratamientos	35
3.8.	PREPARACIÓN DEL INOCULO DE LEVADURA.....	36
3.8.1.	Activación de <i>S. cerevisiae</i> ATCC 4126	36
3.9.	FERMENTACIÓN	37
3.10.	DESTILACIÓN DE LA MUESTRA FERMENTADA	38
3.11.	DETERMINACIÓN DEL BIOETANOL POR MÉTODO DE REFRACTOMETRÍA.....	39
3.11.1.	Preparación de la curva de calibración para las concentraciones de bioetanol (g/L)	39
3.11.2.	Determinación de las concentraciones de bioetanol de los diferentes tratamientos	39
3.12.	DETERMINACIÓN DE RENDIMIENTO DE BIOETANOL	40
3.13.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	41
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	42

4.3. EFECTO DE LOS PARÁMETROS DE PRETRATAMIENTO EN LAS CONCENTRACIONES DE BIOETANOL.....	46
4.4. RENDIMIENTO DE BIOETANOL.....	48
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PARÁMETROS DEL PRETRATAMIENTO EN OBTENCIÓN DE BIOETANOL.....	50
4.6. VALIDACIÓN DE LA RESPUESTA PREVISTA EN LA CONDICIÓN ÓPTIMA	57
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	58
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	60
VII. ANEXO	68

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Residuo Orgánico de Raquis. Fuente: Turrado <i>et al.</i> (2009)	7
Figura 2. Fruto de <i>M. paradisiaca</i> . Fuente: Ramírez <i>et al.</i> (2010).....	8
Figura 3. Fruto de <i>M. cavendish</i> . Fuente: Ramírez <i>et al.</i> (2010).....	9
Figura 4. Composición presente en la pared celular de las plantas. Fuente: Shleser, 1994.	11
Figura 5. Ecuación de la Fermentación de glucosa y producción de alcohol.....	18
Figura 6. Equipo de destilación al vacío. Fuente: Barroso, 2010.	22
Figura 7. Refractómetro. Fuente: Skoog <i>et al.</i> , 2003.....	24
Figura 8. Reacción enzimática del etanol. Fuente: Atkins & Jones, 2012	24
Figura 9. Raquis de banano de la variedad <i>Musa cavendish</i> del departamento de Ancash, provincia del Santa, distrito de Chimbote.....	29
Figura 10. Limpieza y desinfección del raquis de <i>M. cavendish</i>	31
Figura 11. Tratamiento mecánico (trituration) de las muestras de raquis.....	31
Figura 12. Preparación de ácido sulfúrico diluido a diferentes concentraciones.....	32
Figura 13. Hidrólisis ácida diluida del raquis de <i>M. cavendish</i>	33
Figura 14. Determinación de azúcares reductores de la muestra hidrolizada.....	34
Figura 15. Determinación de la concentración de glucosa (g/L) mediante kit Glicemia enzimática AA (Weimar lab.).....	35
Figura 16. Ajuste de pH del medio hidrolizado del raquis.	37
Figura 17. Destilación del medio fermentado mediante un rotavapor.....	38
Figura 18. Concentraciones de bioetanol (g/L) de los tratamientos mediante el método de Refractometría.....	39
Figura 19. Gráfico de superficie de respuesta de las concentraciones de bioetanol.....	53
Figura 20. Gráfico de contornos de las concentraciones de bioetanol obtenidas del raquis <i>M. cavendish</i>	54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de los residuos del banano.	7
Tabla 2. Producción de banano en el Perú, en toneladas.	10
Tabla 3. Producción de banano orgánico por región, en toneladas.	10
Tabla 4. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y desechos.	13
Tabla 5. Tipos de pretratamientos en materiales lignocelulósicos.	15
Tabla 6. Codificación de los valores usados en DCCR para dos variables.	27
Tabla 7. Diseño experimental según DCCR para 2 variables.....	28
Tabla 8. Componentes para el medio de levadura <i>S. cerevisiae</i> ATCC 4126.	36
Tabla 9. Componentes para el medio de fermentación.	37
Tabla 10. Condiciones para el proceso de destilación del medio fermentado.	38
Tabla 11. Caracterización química del raquis de <i>M. cavendish</i> en base seca.	42
Tabla 12. Concentraciones de azúcares reductores obtenidos en la hidrólisis ácida en los pretratamientos.....	44
Tabla 13. Concentraciones de bioetanol obtenidas en la destilación de los diferentes tratamientos.....	46
Tabla 14. Rendimiento de Bioetanol.	48
Tabla 15. Coeficientes de regresión para la variable de concentración de bioetanol (g/L)	50
Tabla 16. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable de concentración de bioetanol del raquis en la hidrólisis ácida.....	52
Tabla 17. Valores críticos del análisis en software STATISTICA.....	56
Tabla 18. Resultados de la fermentación del raquis de <i>M. cavendish</i>	57

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Caracterización físico químico de la materia prima	68
ANEXO 2. Curva patrón para la determinación de azúcares reductores por el método de dns 3,5-ácido dinitrosalisilico (DNS) (Miller, 1959).....	71
ANEXO 3. Curva patrón para la determinación de glucosa por kit glicemia enzimática AA (Weimar Lab.).....	74
ANEXO 4. Preparación del inculo de levadura	77
ANEXO 5. Fermentacion de la muestra hidrolizada.....	78
ANEXO 6. Curva patrón para la determinación de bioetanol por el método de refractometría.....	80
ANEXO 7. Determinación de rendimiento de bioetanol	83
ANEXO 8. Análisis estadístico	84

RESUMEN

La conversión de biomasa lignocelulósica en carbohidratos monoméricos es económicamente beneficiosa y adecuada para la producción sostenible de biocombustibles. La hidrólisis de la biomasa lignocelulósica es un pretratamiento que permite la descomposición de esta biomasa en azúcares fermentables. Por eso, este trabajo de investigación tuvo como principal objetivo evaluar la influencia de la temperatura y concentración de ácido sulfúrico en la hidrólisis ácida de raquis del banano, variedad *Musa cavendish*, para la obtención de bioetanol por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126. Los parámetros del proceso se evaluaron estadísticamente utilizando la metodología de superficie de respuesta basada en un diseño completo central rotacional (DCCR). Los parámetros del proceso investigado fueron la concentración de ácido sulfúrico (3 a 7% v/v), y la temperatura (100 a 140°C). La temperatura de 120°C y 5% v/v de ácido sulfúrico proporcionó la mayor concentración de bioetanol de 9 g/L, y con 148.28°C y 5% v/v de ácido sulfúrico la menor cantidad de bioetanol de 0.85 g/L. En condiciones óptimas del diseño experimental (ácido sulfúrico 5.63% v/v y 115.09 °C), se obtuvo 19.03 g/L de azúcares reductores y 15.5 g/L de glucosa, obteniéndose la máxima concentración de bioetanol de 9.13 g/L.

Palabras claves: Raquis, hidrólisis ácida, temperatura, bioetanol.

ABSTRACT

The conversion of lignocellulosic biomass into monomeric carbohydrates is economically beneficial and suitable for the sustainable production of biofuels. The hydrolysis of the lignocellulosic biomass is a pretreatment that allows the decomposition of this biomass in fermentable sugars. Therefore, the main objective of this work was to evaluate the influence of temperature and concentration of sulfuric acid on the acid hydrolysis of rachis *Musa cavendish* variety, to obtain bioethanol by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126. The process parameters were statistically evaluated using the response surface methodology based on a complete rotational central design (DCCR). The parameters of the investigated process were the concentration of sulfuric acid (3 to 7% v/v), and the temperature (100 to 140°C). The temperature of 120°C and 5% v/v sulfuric acid provided the highest concentration of 9 g/L bioethanol, and with 148.28°C and 5% v/v sulfuric acid the lowest amount of 0.85 g/L bioethanol. In optimal conditions of the experimental design (sulfuric acid 5.63% v/v and 115.09 °C), obtained 19.03 g/L of reducing sugars and 15.60 g/L of glucose, obtaining the maximum concentration of bioethanol of 9.13 g/L.

Keywords: Rachis, acid hydrolysis, temperature, concentration, bioethanol.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la problemática sobre el calentamiento global (Holum, 1990) y el desabastecimiento potencial del petróleo (Buenrostro *et al.*, 2001), está generando grandes interés por desarrollar combustibles renovables y que sean más amigables con el medio ambiente. Por ello, los biocombustibles están siendo considerados como una nueva fuente de energía alternativas en muchos países, que se pueden generar gracias a los avances de la Biotecnología (Eggeman & Elander, 2005).

El bioetanol obtenido de materias primas de origen vegetal como la caña de azúcar, la remolacha y el maíz se produce, como sustituto de los combustibles fósiles (Bandaru, 2007). Por esta razón, es importante generar grandes cantidades de estos biocombustibles que permitan cubrir las altas demandas de carburantes líquidos y a la vez reducir costos de producción. Que se pueden obtener aprovechando los residuos lignocelulósicos como sustratos para la fermentación (Fujita *et al.*, 2004), creando una gran ventaja en nuestro país, por ser uno de los países con mayor actividad agrícola y por ende un país que genera grandes cantidades de este tipo de residuos lignocelulósicos que pueden dar solución a esta crisis energética (Thomsen *et al.*, 2009).

Según el Ministerio de Agricultura el Perú es un país que cuenta con 300 mil hectáreas destinadas a la agricultura de los cuales el 50% se dedica a la producción y siembra de frutales, siendo, el banano orgánico la producción más alta de frutales sembrados en regiones como Piura, Tumbes y San Martín (Hendrics & Zeeman, 2008). Debido a esta producción de banano en estas regiones se encuentran altas cantidades de residuos lignocelulosicos del banano como hojas, pseudotallo y raquis que pueden servir para la producción de bioetanol gracias a su composición de estos residuos que contienen alto contenido de celulosa y hemicelulosa (Escalante & Fuentes, 2013), que mediante procesos de transformación pueden ser utilizados para la obtención de bioetanol (Sánchez & Valarezo, 2014).

A pesar de la atractiva composición que tienen los residuos lignocelulósicos, se encuentra una parte crítica en el proceso de transformar el material lignocelulósico en azúcares fermentables. Debido a la complejidad de la estructura del material que impide que los agentes biológicos realicen su transformación en bioetanol. Por esta razón es necesario que se realice un pretratamiento del material que degrade la pared celular antes de iniciar la fermentación. (Guanizo *et al.*, 2012). El pretratamiento es considerado como el proceso crítico en la conversión de la biomasa en bioetanol (Yang & Wyman, 2008) y son varias las tecnologías que han sido ensayadas (Zhao *et al.*, 2008). Existen muchos tipos de pretratamientos para trabajar con el material lignocelulósico. Sin embargo el más aplicado es la hidrólisis ácida con ácidos diluidos utilizando altas temperaturas por ser un pretratamiento de fácil aplicación y de bajo costo, si se controlan las condiciones del pretratamiento como la temperatura en la etapa de hidrólisis ácida y concentración de ácido sulfúrico (Cortínez, 2010).

Se han reportado investigaciones sobre la influencia de temperatura y concentración del ácido sulfúrico de materiales lignocelulósicos en la hidrólisis ácida para obtención de bioetanol. Abril (2016) evaluó los parámetros óptimos de concentración de ácido sulfúrico, tiempos de reacción y temperaturas para la hidrólisis ácida de residuos del banano con la finalidad de obtener mayores rendimientos de glucosa. Para su trabajo de investigación utilizó como materia prima hojas, tallo, raquis y cascara de banano a los que aplicó hidrólisis ácida, utilizando concentraciones de ácido sulfúrico de 3,6 y 10% v/v, tiempos de reacción de 15, 30 y 60 min, y temperaturas de 60 y 93 °C. Sus resultados reportaron que las mejores condiciones para obtener altas concentraciones de glucosa fueron a una temperatura de 93°C y concentración de 3%.

Cevallos y Chariguaman (2016) en su trabajo de investigación evaluaron cual era el efecto de la temperatura (104, 109, 120, 131, 136°C) con la concentración de ácido sulfúrico (4.6, 5, 6, 7 y 7.4% v/v) para la obtención de las mejores concentraciones de azúcares a partir de rastrojos de maíz. En su trabajo de investigación utilizaron el diseño compuesto central rotacional para determinar el efecto de las variables independientes sobre la producción de azúcares. Como resultados evidenciaron que los grados Brix aumentaron su valor de 6 a 16 cuando se disminuyó la temperatura y se aumentó la concentración de ácido. La glucosa incrementó de 0.5 a 2.5% cuando se aumentó la temperatura y se disminuyó la concentración de ácido. Y finalmente los AR aumentaron al aumentar tanto la concentración como la temperatura.

Bastidas (2013) realizó una comparación entre dos pretratamientos de hidrólisis (alcalino y ácido) para evaluar la efectividad de estos pretratamientos en el raquis de palma africana (*Elaeis guineensis*) para poder utilizar este material lignocelulósico en la producción de bioetanol de segunda generación. La investigación consistió en realizar el pretratamiento químico utilizando ácido sulfúrico a una concentración de 1%p/v y temperaturas de 160°C y 170°C. Como resultados reportó que las mejores condiciones para la obtención óptima de sacáridos totales y rendimiento de bioetanol (5.2 g/L y 5.8 g/L) fueron los pretratamientos ácidos llevados a 160°C y 20 minutos de reacción a partir de raquis de palma africana.

Narendra *et al.* (2017) en su trabajo de investigación optimizaron las condiciones de hidrólisis ácida del sorgo marrón IS11861 para maximizar el rendimiento de azúcares de pentosa con niveles minimizados de inhibidores fermentativos a bajas concentraciones de ácido. Los parámetros del proceso investigados fueron ácido sulfúrico (0.2 a 1M) y la temperatura (80 a 121 °C). En condiciones óptimas (ácido sulfúrico 0,2 M, 121 °C y 120 min), el 97,6% de la hemicelulosa se convirtió en xilobiosa con 18.02 mg/g, xilosa de 225.2 mg/g y arabinosa con un valor de 20.2 mg/g con baja concentración de Furfural (4,6 mg/g). Además, los parámetros del proceso se optimizaron estadísticamente utilizando la metodología de superficie de respuesta aplicando un diseño completo central rotacional. Debido a la presencia de una baja concentración de inhibidores fermentativos, obtuvieron 78,6 y 82,8% del rendimiento teórico de etanol durante la fermentación de hidrolizados.

Nigam (2001), trabajó en la producción de etanol a partir de hidrolizado de ácido de paja de trigo, donde las condiciones de la hidrólisis ácida fue a una temperatura de 90°C y ácido sulfúrico 1.85% p/v. El hidrolizado utilizado tuvo la siguiente composición (expresado en g/L): xilosa 12.8, glucosa 0.25, arabinosa 2.6 y ácido acético 2.7. El ácido acético, los furfurales y las ligninas presentes en el hidrolizado fueron inhibidores del crecimiento microbiano y la producción de etanol, la adición de estos componentes inhibidores resultó una reducción respecto al rendimiento de etanol y la productividad. En este trabajo se reportó un rendimiento de etanol (Y_p/s) de 0.41 g/g, equivalente a 80.49% del rendimiento teórico.

En otros estudios Zaafouri *et al.*, (2017) optimizaron la hidrólisis ácida de Tunisian *Luffa cylindrica* a través del diseño experimental compuesto central cúbico CCD, lo autores controlaron el proceso mediante la determinación de azúcares reductores. Los parámetros del proceso investigados fueron ácido sulfúrico (0.5 a 5%), la temperatura (80 a 120 °C) y tiempo de reacción (30 a 60 minutos). En condiciones óptimas el rendimiento de conversión del azúcar reductor a etanol fue del 88,66%. Después de la etapa de destilación, la concentración de etanol fue de 1.58% con un rendimiento volumétrico de alrededor del 70%.

El interés constante de mejorar la calidad de vida actualmente ha permitido que se desarrollen nuevas tecnologías con el propósito de remediar la contaminación y hallar nuevas alternativas energéticas que sean renovables. Este problema está en manifiesto dentro de nuestro país, y se encuentra en grandes cantidades en la Región de Piura y a la vez en pequeños sectores agrícolas de Chimbote en menores cantidades, donde tenemos como residuos lignocelulosicos las hojas, pseudotallo y raquis de banano. De los cuales el raquis puede ser aprovechado como materia prima en la producción de bioetanol gracias a su importante contenido de celulosa.

El uso de los pretratamientos ácidos es más común para hidrolizar los residuos lignocelulosicos, a comparación de métodos biológicos lo cual la tasa de hidrólisis es demasiado lenta. Sin embargo los pretratamientos ácidos deben ser llevados a cabo controlando adecuadamente los parámetros como temperatura y ácido con la finalidad de reducir la presencia de subproductos tóxicos de la fermentación y aumentar la concentración de azúcares reductores para producir bioetanol. Hasta la fecha, no se han reportado estudios sobre la evaluación del efecto que tiene la temperatura y la concentración del ácido en el proceso de hidrólisis ácida utilizando como materia prima raquis de banano variedad *M. cavendish*, que permita obtener información de las mejores condiciones de la hidrólisis ácida para este residuo lignocelulósico.

Este proyecto es importante porque pretende encontrar las condiciones óptimas de temperatura y también las concentraciones de ácido sulfúrico en el proceso de hidrólisis ácida para obtener bioetanol a partir de raquis, siendo esto hoy en día aun un tema de estudio. Asimismo, es importante porque pretende encontrar una alternativa ambiental que permita reducir la contaminación y el uso de combustibles fósiles que generan problemas ambientales y sociales.

En base a lo expuesto se formula el siguiente problema: ¿Cuál es la influencia de la temperatura y concentración de ácido sulfúrico en la hidrólisis ácida de raquis del banano, variedad *Musa cavendish*, para la obtención de bioetanol por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126?

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

Evaluar la influencia de la temperatura y concentración de ácido sulfúrico en la hidrólisis ácida de raquis del banano, variedad *Musa cavendish*, para la obtención de bioetanol por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126.

1.1.2. Objetivos específicos

Caracterizar los parámetros químicos del raquis de banano *Musa cavendish*.

Evaluar el pretratamiento de hidrólisis ácida del residuo lignocelulósico con diferentes temperaturas y concentraciones de ácido sulfúrico para la obtención de azúcares reductores.

Determinar los niveles óptimos de la concentración de ácido sulfúrico y temperatura en la obtención de azúcares reductores para la producción de bioetanol por la Metodología Superficie de Respuesta, Diseño Completo Central Rotacional (DCCR).

1.2. HIPÓTESIS:

La concentración de ácido sulfúrico de 5% v/v y una temperatura de 120°C son condiciones favorables y óptimas en la hidrólisis ácida para el pretratamiento del material lignocelulósico del raquis *M. cavendish*; obteniendo con estos valores óptimos un mayor rendimiento de bioetanol.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. MATERIA PRIMA

2.1.1. Raquis de banano

El raquis hace referencia al tallo de inflorescencia, el mismo que se forma del primer fruto y termina en la yema masculina. Generalmente esta descubierto por brácteas. El raquis después del empaque de la planta de banano, se convierte en desecho lignocelulósico (Saborio, 1981). Según Quihue (2014), del raquis nacen los frutos del banano que pueden ser cientos de frutos de color verde claro (Fig. 1). Su composición es de 93% de agua, materia sólida 7%, de las cuales el 40% corresponde a fibra, un 11.7% de lignina y celulosa de 53%. (Shedden, 1978).



Figura 1. Residuo Orgánico de Raquis. Fuente: Turrado *et al.* (2009)

2.1.2. Composición química del raquis de banano

La composición química del banano orgánico peruano descrita en la tabla 1, fue determinada por Santa María *et al.* (2013), en su proyecto sobre la caracterización y bioconversión de los residuos lignocelulósicos generados de la producción bananera para la producción de biocombustibles en las comunidades agrícolas rurales en Perú y Colombia.

A continuación, se muestra la composición de los residuos del cultivo de banano.

Tabla 1. Composición química de los residuos del banano.

Componente (%)	Pseudotallo	Hojas	Raquis
Ceniza	28.30 ± 0,54	16.10 ± 0,68	9.6 ± 1,52
Lignina	15.07 ± 0.66	24.84 ± 1.32	10.05 ± 1,31
Celulosa	31.27 ± 3.61	25.75 ± 1.42	31.02 ± 0,69
Hemicelulosa	14.98 ± 2.03	17.08 ± 1.11	27.39 ± 0,25
Humedad	10.00 ± 1.03	8.40 ± 1.50	8.70 ± 2.25

FUENTE: (Santa María *et al.*, 2013)

2.1.3. Variedades de banano

Las variedades de banano difieren por dimensión, sabor y estructura de la pulpa. Según la Sociedad Española de productos húmicos (2009), dentro de la familia de las Musáceas, conocidas vulgarmente por Plátanos y Bananos, las variedades más importantes producidas y consumidas a nivel mundial son las siguientes:

La *Musa paradisiaca*, representa el 30% de la producción del género. Técnicamente son considerados los verdaderos plátanos y pueden consumirse solo si son cocidos. Se usan en innumerables platos de la cocina (Fig. 2). Es el gran "plátano de cocción", más plano y más largo que el banano *cavendish* común. Tiene una textura firme y un sabor suave, similar a una calabaza. La pulpa del plátano tiene menos azúcar, pero más almidón que las otras variedades de musáceas.

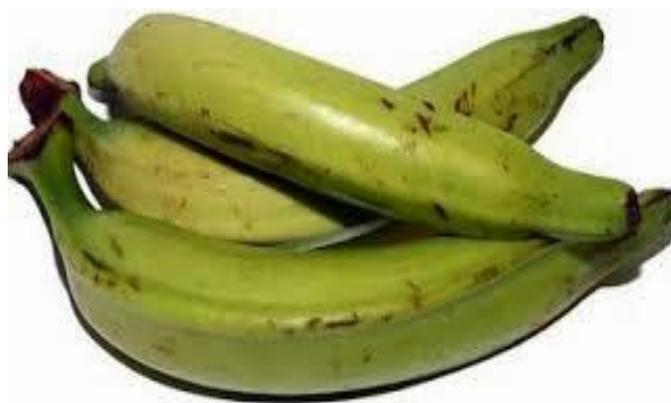


Figura 2. Fruto de *M. paradisiaca*. Fuente: Ramírez *et al.* (2010)

La *Musa cavendish*, representa de la producción del género el 70%. Esta variedad consideradas como bananas, previa maduración natural o inducida, y son consumidas en todo el mundo como fruta fresca. Su tamaño puede ser de 6 hasta 10 pulgadas de longitud. La parte exterior del banano es verde y tornan de color amarillo cuando maduran. (Fig. 3).



Figura 3. Fruto de *M. cavendish*. Fuente: Ramírez *et al.* (2010)

2.1.4. Situación del cultivo de banano

En el Perú se aproxima 300 mil hectáreas cultivadas de frutales, de estas hectáreas donde el 50% es de plátano y banano. Del cultivo de banano en el Perú, el 4% es de banano orgánico de la variedad *cavendish*, donde se ubica en el norte de Perú. En la actualidad, el banano es cultivado en diferentes departamentos de Perú como son: Piura, San Martín, Amazonas, Madre de Dios, Loreto, Ucayali, Cajamarca, Junín, Huancayo, Pasco, Tumbes y Cusco (MINAGRI, 2016).

Las tablas 2 y 3 se muestran la producción de banano orgánico según año, enero-diciembre 2012-2016 en el Perú y la producción de banano por región de enero y diciembre del 2015-2016. De otro lado, las exportaciones de banano orgánico peruano han mantenido un crecimiento moderado y sostenido, en respuesta a las nuevas áreas de banano que entraron en producción, en Piura, Tumbes y Lambayeque, regiones que en conjunto concentran el 100% de la producción y oferta exportable de banano orgánico.

Tabla 2. Producción de banano en el Perú, en toneladas.

Banano	Miles de toneladas				
	2012	2013	2014	2015	2016
Perú	2 082,1	2 113,8	2 125,8	2 056,3	2 072,9

FUENTE: (MINAGRI, 2016)

Tabla 3. Producción de banano orgánico por región, en toneladas.

Región	Miles de toneladas	
	2015	2016
Amazonas	137,4	137,3
Cajamarca	38,9	39,1
Cuzco	33,8	33,0
Huancayo	0,5	0,5
Junín	195,0	191,3
Loreto	268,0	276,1
Madre de Dios	18,9	19,9
Pasco	95,7	92,6
Piura	263,8	274,3
San Martín	383,6	385,7
Tumbes	103,6	114,9
Ucayali	274,4	262,4

FUENTE: (MINAGRI, 2016)

2.1.5. Aprovechamiento tradicional del raquis

Las hojas y el raquis de la planta de banano, son utilizados como abono para los suelos en donde son cultivados. Hoy en día, se vienen indagando varias alternativas para dar un aprovechamiento a estos residuos orgánicos (raquis) que suelen ser un elemento contaminante del medio ambiente si no se dispone racionalmente del mismo. Álvarez *et al.* (2013), en Colombia proponen la producción de lixiviado a partir de raquis de plátano en el eje cafetero de Colombia. Por otro lado, Ayala *et al.* (2016), determinó la composición química del como residuo en alimento para cerdos en ceba.

2.2. ESTUDIO DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

2.2.1. Definición de material lignocelulósico

La lignocelulosa se define como un sustrato complejo, que está conformado por combinaciones de polisacáridos de la celulosa y lignina. Es el componente principal de la pared celular en las plantas, donde las proporciones cambian dependiendo del tipo de material lignocelulósico (Tomás, 2010).

El material lignocelulósico es heterogéneo, donde la hemicelulosa y lignina envuelven a la celulosa son considerados. Las proporciones de los componentes de la lignocelulosa varían en cuanto al tipo de material: celulosa (35 - 50%), hemicelulosa (20 - 40%) y lignina (15 - 30%), la estructura y composición del material son importantes para poder determinar que procesos se deben realizar en la producción (Shleser R, 1994). La composición de la pared celular de las plantas se muestra en la figura 4.

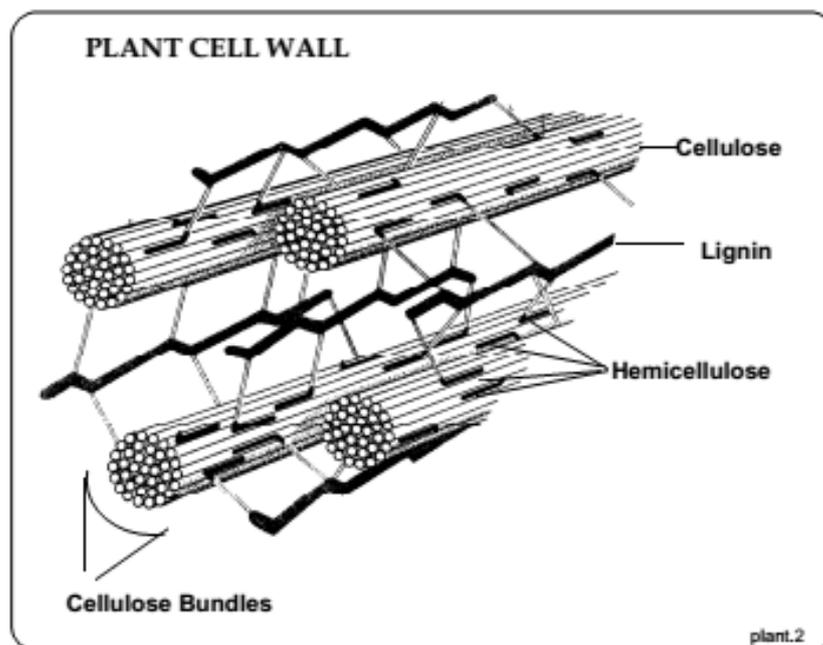


Figura 4. Composición presente en la pared celular de las plantas. Fuente: Shleser, 1994.

2.2.2. Composición del material lignocelulósico

Según Fengel & Wegener (1984), la composición de los materiales lignocelulósicos está constituido por polisacáridos (hemicelulosa y celulosa), compuestos fenólicos (lignina) y compuestos minoritarios (lípidos, minerales y proteínas). La morfología de fibras varía de la composición y la organización estructural de estos constituyentes. La cantidad y el tipo de estos compuestos pueden influir en procesos industriales (Escalante & Fuentes, 2013).

2.2.2.1. Celulosa

La celulosa es un polímero lineal de moléculas de D-glucosa unidas por enlaces β -glucosídicos (Cunningham & López, 1994). La celulosa se encuentra en las paredes celulares de diferentes plantas en forma de fibras cristalinas que permite determinar la dirección del crecimiento celular y la rigidez para que las plantas puedan desarrollarse.

La celulosa al ser un material cristalino presenta una resistencia mecánica alta y estabilidad química. Los enlaces glicosídicos son los más débiles en toda la cadena, es allí que el polímero es hidrolizado en azúcares debido a la presencia de agua. La estructura cristalina presenta dislocaciones del 15% de la estructura de la celulosa en algunas zonas de las cuales son susceptibles en el procedo de la hidrólisis (Narvaes & Martin, 2006). La celulosa es un polisacárido importante como materia prima para la obtención de glucosa mediante hidrolisis que, al ser usadas en las industrias de fermentaciones, permite obtener una gran gama de productos como el etanol de uso como combustible (Castillo, 2005).

2.2.2.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa consiste en una estructura compleja conformada de carbohidratos por polímeros diferentes, tales como: las pentosas (xilosa y arabinosa), las hexosas (glucosa, manosa y galactosa), y los ácidos urónicos. El componente principal de la hemicelulosa en ciertos materiales vegetales como el caso de las maderas duras son los xilanos y para las maderas suaves el glucomamano. La hemicelulosa considerada como polímero tiene peso molecular muy bajo a comparación de la celulosa y son fácilmente hidrolizable debido a que contienen ramificaciones con cadenas laterales cortas de diferentes azúcares (Hendriks & Zeeman , 2009).

2.2.2.3. Lignina

La lignina es un polímero que está presente en la naturaleza. Es un heteropolímero amorfo de la cual está constituido por tres diferentes unidades como fenilpropano (p-coumaril, coniferil y alcohol sinapil) conectados por enlaces diferentes. La importancia de la lignina es permitir el soporte estructural en las plantas, impermeabilidad y la resistencia a la presencia microbiana o estrés oxidativo. La degradación de la lignina es difícil debido a que esta es insoluble en agua y ópticamente inactivo (Fengel y Wegener, 1984).

2.2.3. Lignocelulosa en la industria de biocombustibles

Medina *et al.* (2011) mencionan que actualmente, los residuos lignocelulósicos son considerados como materia prima ya que se puede obtener etanol más amigable. Para el aprovechamiento de los materiales es importante realizar tres procesos principalmente: pretratamiento, hidrólisis del material y producción de etanol.

En la presente tabla 4, se muestra la cantidad de celulosa, hemicelulosa y lignina en los diferentes residuos lignocelulósicos.

Tabla 4. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y desechos.

Material lignocelulósico	Lignina (%)	Hemicelulosa (%)	Celulosa (%)
Hojas	0	80 - 85	15 - 20
Cascara de nuez	30 - 40	25 - 30	25 - 30
Residuos de pastos	18 - 30	35 - 40	25 - 40
Paja de trigo	15	50	30
Madera	18 - 25	24 - 40	45 - 55
Pastos	12	31 - 40	45
Olote de maíz	18 - 30	35	45
Algodón	0	0	80 - 95
Papel	0 - 15	0	85 - 99

Fuente: (Sun & Cheng, 2002)

2.3. PRETRATAMIENTO DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

El fin de someter los materiales lignocelulósicos a un pretratamiento es poder permitir la hidrólisis de la celulosa y obtener azúcares fermentables para la producción de etanol. La lignocelulosa está compuesta por un conjunto de celulosa, hemicelulosa y lignina de las cuales están conectados mediante enlaces covalentes, puentes intermoleculares y por la fuerza de Van der Waals, esto hace que sea altamente resistente a la hidrólisis (Kumar *et al.*, 2010).

La principal importancia de los pretratamientos en los materiales lignocelulósicos es permitir la hidrólisis de la celulosa debido a que su conformación natural (cristalina), es muy resistente a la hidrólisis. Los pretratamientos causan en la celulosa la generación de regiones amorfas permitiendo que sean más susceptibles a la hidrólisis (Hu & Wen, 2008).

Existen diferentes pretratamientos con el mismo propósito, en donde el proceso empieza con un tratamiento mecánico, así como la disminución del tamaño de la partícula y la disminución de la polimerización de ciertos compuestos (Palmowski & Müller, 2000). En los pretratamientos térmicos se emplean temperaturas altas (150 – 180°C) donde se solubiliza la hemicelulosa y lignina, permitiendo la accesibilidad de la celulosa a la hidrólisis, ver tabla 5. Otros pretratamientos son los que se emplean con ácidos lo cual permite de igual manera que los pretratamientos térmicos la solubilización de la lignina y hemicelulosa (Hendriks & Zeeman, 2009).

Tabla 5. Tipos de pretratamientos en materiales lignocelulósicos.

Métodos	Procedimientos	Referencia
Pulverizado Mecánico	Molienda	Sun y Cheng, 2002
Pirolisis	Temp. > 300 °C	Yu y Zhang, 2003
Explosión a vapor	Vapor saturado a 160 - 260 °C, p= 0.69 - 4.85 MPa por unos segundos o minutos y liberación de presión hasta presión atmosfera	Soderstrom <i>et al.</i> , 2003
Agua líquida Caliente	Agua caliente a presión T= 170 - 230 °C 1 – 46 min	Lynd <i>et al.</i> , 2002
Explosión de fibra con amoníaco	1 - 2 Kg de amoníaco/kg de material seco 90 °C/30 min	Chundawat <i>et al.</i> , 2007
Explosión con CO ₂	4 kg de CO ₂ /kg de material p= 5.62 MPa	Sun y Cheng, 2002
Ozonolisis	Ozono a temperatura y presión ambiente	Sun y Cheng, 2002
Hidrolisis con Acido diluido	H ₂ SO ₄ , HCl, HNO ₃ 1-5% (T= 120 - 160 °C 1, MPa	Rodriguez-Chong <i>et al.</i> , 2004
Hidrolisis con acido concentrado	H ₂ SO ₄ 10 - 30%, ácido peracético 21 - 60% (T= 170 - 190 °C)	Teixeira <i>et al.</i> , 1999
Hidrolisis alcalina	NaOH diluido, 24 h/60 °C	Sun y Cheng, 2002
Organosolventes	Solventes orgánicos y su mezcla con 1% de H ₂ SO ₄ y HCl	Lynd <i>et al.</i> , 2002

FUENTE: Medina *et al.* (2011)

2.3.1. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida consiste en un proceso químico que, mediante el empleo de catalizadores ácidos, transforma las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa (hemicelulosa y celulosa) en sus monómeros elementales (Barroso, 2010). Este tipo de pretamiento según Larsson *et al.* (2000) como consecuencia de las altas temperaturas empleadas, los azúcares originados en la hidrólisis, principalmente de la hemicelulosa, se degradan originando dos compuestos derivados del furano: el furfural, formado a partir de la degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa) y el 5-hidroximetilfurfural, formado a partir de la degradación de las hexosas (glucosa, manosa y galactosa). Además, se originan ácido alifático (fórmico y levulínico) y ácido acético procedente de la hidrólisis de los restos acetilos de la hemicelulosa que provocan la disminución en la productividad de etanol.

Este tipo de hidrólisis puede realizarse empleando diferentes clases de ácidos como el ácido sulfúrico, clorhídrico, fosfórico, nítrico y fórmico (Galbe & Zacchi, 2002). Sin embargo, sólo los ácidos clorhídrico y sulfúrico han sido empleados a escala industrial. Los procesos industriales de hidrólisis ácida pueden agruparse en dos tipos: los que emplean ácidos concentrados y los que utilizan ácidos diluidos (Oliva, 2003).

2.3.1.1. Hidrólisis con ácidos concentrados

Este tipo de hidrólisis utiliza una concentración de ácido en el intervalo de 10 a 30% p/p y los tiempos de reacción son normalmente más largos que en los procesos de hidrólisis con ácido diluido, presentando una completa y rápida conversión de la celulosa en glucosa y de la hemicelulosa en pentosas con una baja degradación de dichos azúcares (Mustafat, 2011).

Estos procesos operan a baja temperatura, pudiendo obtenerse altos rendimientos de hidrólisis (superiores al 90% de la glucosa potencial) (Barroso, 2010; Keller, 1996; Oliva, 2003). A pesar de esto, la gran cantidad de ácido empleado en la impregnación del material a tratar y lo costoso de su recuperación, unido a los efectos corrosivos de los ácidos concentrados que obliga a altas inversiones en los equipamientos, hacen que el proceso no sea rentable. Además, tiene el problema asociado de que es necesario una costosa etapa de neutralización antes de la fermentación (Keller, 1996; Mustafat, 2011).

2.3.1.2. Hidrólisis con ácidos diluidos

El proceso con ácido diluido es uno de los métodos más antiguos, simples y más eficientes que se usan en la producción de etanol a partir de biomasa (Brennan *et al.*, 1986). Este proceso es llevado a altas temperaturas y presiones con tiempos de reacción cortos que van desde segundos hasta algunos minutos lo cual facilita un proceso continuo. Este método usa concentraciones de ácido entre 2 y 5% y requiere de altas temperaturas (110 – 160° C) y presiones hasta 10 atmósferas. Debido al bajo rendimiento de glucosa a partir de la celulosa, el rendimiento de etanol es pobre también, por lo que este método es típicamente para el pretratamiento, donde no se requieren de concentraciones de ácido muy altas para remover la hemicelulosa (Iranmahboob, 2011).

Las temperaturas que se emplean en estos procesos originan, por un lado, una mayor corrosión de los equipos empleados y, por otro lado, aumenta la tasa de degradación de los azúcares hemicelulósicos los cuales pueden afectar a la posterior etapa de fermentación (Wyman, 1996). Al utilizar ácidos diluidos la principal ventaja que se tiene es el relativo bajo consumo de ácidos, sin embargo, se deben emplear altas temperaturas para alcanzar rendimientos aceptables de conversión (Oliva 2003).

El proceso consta de dos etapas, la primera etapa se desarrolla a baja temperatura para maximizar la producción de la hemicelulosa para obtener pentosas y hexosas de la celulosa amorfa. Esta etapa usa ácido sulfúrico al 0.7% a 190°C para hidrolizar la hemicelulosa presente en la biomasa (Brennan *et al.*, 1986; Mustafat, 2011). La segunda etapa consiste en la hidrólisis de la celulosa y obtener hexosas, la cual es la fracción más resistente. Se lleva a cabo con la adición de ácido sulfúrico a 0.4% y a una temperatura de 215°C. El hidrolizado líquido es neutralizado y es necesario remover los compuestos tóxicos generados antes de ser enviado a la fermentación (Cunningham & López, 1994).

2.4. FERMENTACIÓN

La fermentación se define como el conjunto de reacciones químicas que sufre una sustancia orgánica vegetal como los carbohidratos o sus derivados por medio de ciertos microorganismos (bacterias, levaduras y mohos) y que generalmente van acompañados de un desprendimiento gaseoso y producción de energía (Vázquez & Dacosta, 2007).

La fermentación alcohólica es una bioreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la ecuación:

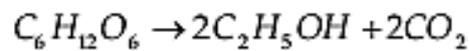


Figura 5. Ecuación de la Fermentación de glucosa y producción de alcohol.

Fuente: Vázquez & Dacosta, 2007.

Las principales responsables de esta transformación son las levaduras. La *Saccharomyces cerevisiae*, es la especie de levadura usada con más frecuencia. Por supuesto que existen estudios para producir alcohol con otros hongos y bacterias, como *Zymomonas mobilis*, pero la explotación a nivel industrial es mínima.

A pesar de parecer, a nivel estequiométrico, una transformación simple, la secuencia de transformaciones para degradar la glucosa hasta dos moléculas de alcohol y dos moléculas de bióxido de carbono es un proceso muy complejo, pues al mismo tiempo la levadura utiliza la glucosa y nutrientes adicionales para reproducirse. Para evaluar esta transformación, se usa el rendimiento biomasa/sustrato y el rendimiento producto/ substrato (Galvis, 2009).

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO₂ por 1 g de glucosa. El rendimiento experimental varía entre 90% y 95% del teórico, es decir, de 0.469 a 0.485 g/g. Los rendimientos en la industria varían entre 87 y 93% del rendimiento teórico (Boudarel, 1984)

2.4.1. Microorganismos fermentativos

Microorganismos como hongos, bacterias y levaduras pueden ser usados para la fermentación, especialmente las levaduras (*S. cerevisiae*, también conocida como levadura de panificación) son frecuentemente usadas para fermentar glucosa en etanol. Teóricamente, 100 g de glucosa producen 51.4 g de etanol y 48.8 g de dióxido de carbono. Sin embargo, en la práctica, los microorganismos usan algo de la glucosa para el crecimiento y el rendimiento real es menor al 100% (Galvis, 2009).

2.4.1.1. Bacterias

Dentro de las bacterias que producen etanol se encuentra la *Z. mobilis*, la cual es bien conocida y usada históricamente en áreas tropicales para producir alcohol (Skotnicki *et al.*, 1982). Las ventajas de la *Z. mobilis* son su gran velocidad de crecimiento y alta producción específica de etanol, sin embargo, se limita a usar como fuente de carbono la glucosa, fructosa y sacarosa (Okamoto *et al.*, 1993).

2.4.1.2. Levaduras

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo unicelular, ha sido uno de los microorganismos más utilizados en la producción de etanol (Espinoza , 2013). Porque ha demostrado ser un microorganismo muy robusto y adecuado para la fermentación de hidrolizados lignocelulósicos a pesar de que esta levadura no es capaz de fermentar la xilosa ya que carece de enzimas que transformen la xilosa en xilulosa, pero a esta última si es capaz de fermentarla.

Según Mustafat (2011), el alto rendimiento en la producción de etanol y una notable tolerancia al etanol son dos de las principales características que hacen especial a esta levadura para este proceso; estas propiedades inusuales son el resultado de la adaptación a la producción de etanol a partir de hexosas durante miles de años.

Uno de los motivos por el cual la *S. cerevisiae* es la más utilizada para fermentar pre hidrolizados de material lignocelulósico es la capacidad que presenta de fermentar en presencia de sustancias inhibitoras como el furfural y el hidroximetilfurfural (HMF) (Olsson & Hahn-Hagerdal, 1996). Aunque estas sustancias inhiben el crecimiento de la levadura y la tasa de producción de etanol, la levadura es capaz de consumirlas convirtiéndolas en alcohol furfurilico principalmente disminuyendo así su efecto inhibitor (Taherzadeh *et al.*, 1999).

2.4.2. Factores que intervienen en la fermentación alcohólica

2.4.1.3. Temperatura

Las levaduras son microorganismos mesófilos, esto hace que la fermentación pueda tener lugar en un rango de temperaturas desde los 13 – 14°C hasta los 33 – 35°C. Dentro de este intervalo, cuanto mayor sea la temperatura mayor será la velocidad del proceso fermentativo siendo también mayor la proporción de productos secundarios. Sin embargo, a menor temperatura es más fácil conseguir un mayor grado alcohólico, ya que parece que las altas temperaturas que hacen fermentar más rápido a las levaduras llegan a agotarlas antes (Quintero, 1981).

2.4.1.4. pH

El crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se ve favorecido por un pH aproximado de 3.5 a 4.5 y no se desarrollan bien en medio alcalino a menos que se hayan adaptado al mismo. A pesar de la tolerancia bastante amplia de esta para las variaciones de pH a partir de los sustratos habitualmente usados en los medios de cultivo forman productos en especial ácidos que influyen en el crecimiento celular, producción enzimática y utilización de glucosa. Así, por ejemplo, algunas investigaciones han observado que con un pH inicial del medio a valores entre 4.0 y 5.1 se obtiene mejor crecimiento (Scott, 2001).

2.4.1.5. Grado glucométrico

El grado glucométrico se puede medir en equivalencia al °Brix o grados Balling, que es una medida empleada para determinar la riqueza en azúcar de un compuesto. En sentido estricto el °Brix es la concentración en porcentaje en peso de los sólidos contenidos en una solución pura de sacarosa y agua (Doran, 1998).

Las levaduras fermentativas necesitan los azúcares para su catabolismo, es decir para obtener la energía necesaria para sus procesos vitales. El principal nutriente de las levaduras es el carbono, el cual es suministrado por los azúcares contenidos en la materia prima, siendo la concentración de azúcar un valor que se debe considerar ya que afecta la velocidad de la fermentación, el comportamiento y el desarrollo de las células de la levadura (Skountzou, *et al.*, 2003).

2.5. DESTILACIÓN

La destilación es el proceso que se utiliza para llevar a cabo la separación de diferentes líquidos, que se encuentran disueltos en líquidos, o incluso gases de una mezcla, gracias al aprovechamiento de los diversos puntos de ebullición de cada sustancia partícipe, mediante la vaporización y la condensación (Espinosa, 2013). A presión atmosférica las temperaturas de ebullición son 78,2 °C y 100 °C para el etanol y el agua respectivamente, se considera que para realizar una destilación sencilla la diferencia entre puntos de ebullición debe ser unos 70 a 80 °C, por tanto, la destilación de la mezcla etanol agua se realiza por destilaciones sencillas repetidas (Barroso, 2010).

Existen distintos tipos de destilación, siendo los más utilizados hoy en día: la destilación sencilla, la destilación fraccionada y la destilación a vacío.

2.5.1. Destilación sencilla

Es el tipo más básico de destilación en el que el ciclo evaporación- condensación solamente se realiza una vez. Se utiliza un recipiente (matraz de destilación) en el que se calienta la mezcla hasta su punto de ebullición, y un refrigerante en el que se condensan los vapores. En la destilación simple de una mezcla binaria ideal en un intervalo de temperatura, el destilado es una mezcla de composición distinta al líquido original, enriquecida en el componente más volátil, en tanto que el residuo se ha enriquecido en el componente menos volátil (Jian *et al.*, 2011).

2.5.2. Destilación fraccionada

En este tipo de destilación los ciclos de evaporación y condensación se repiten varias veces a lo largo de la columna de fraccionamiento. Es un tipo de destilación mucho más eficiente que la destilación sencilla y permite separar sustancias con puntos de ebullición muy próximos. La eficacia de este tipo de destilación depende del número de platos teóricos de la columna, lo que está en función del tipo y la longitud de la misma (Vázquez & Dacosta, 2007).

Una destilación fraccionada se utiliza habitualmente para separar eficientemente líquidos cuyos puntos de ebullición difieran en menos de 100°C. A continuación, se muestra un equipo estándar para realizar una destilación fraccionada.

2.5.3. Destilación al vacío

En una destilación a vacío la presión en el interior del equipo se hace menor a la atmosférica con el objeto de que los componentes de la mezcla a separar destilen a una temperatura inferior a su punto de ebullición normal. La destilación a vacío se utiliza para destilar a una temperatura razonablemente baja productos muy poco volátiles o para destilar sustancias que descomponen cuando se calientan a temperaturas cercanas a su punto de ebullición normal (Wyman, 1996). Este tipo de destilación se realiza en equipos compactos comerciales denominados genéricamente rota vapores y se usa para eliminar con rapidez el disolvente de una disolución en la que se encuentra presente un soluto poco volátil habitualmente a temperaturas próximas a la temperatura ambiente, con lo que se minimiza el riesgo de descomposición del producto de interés que queda en el matraz de destilación. A continuación, se muestra un esquema de un rotavapor típico (Fig. 6).



Figura 6. Equipo de destilación al vacío. Fuente: Barroso, 2010.

2.6. DETERMINACIÓN DE ETANOL

La determinación de etanol se fundamenta en aprovechar sus propiedades físicas o químicas para identificarlo y para conocer su cantidad en una muestra específica. Según la muestra, este proceso analítico se puede realizar de diferentes formas (Alberts, *et al.*, 2011; Curtis, *et al.*, 2008).

2.6.1. Medición de la densidad utilizando un hidrómetro

Esta medición se fundamenta en conocer la densidad o peso específico de la muestra y relacionarlo con la masa de etanol en la solución hidroalcohólica. El resultado se expresa como porcentaje o grado Gay-Lussac (°GL), utilizando tablas y controlando los parámetros analíticos durante el análisis. Según Griffin (1981) el hidrómetro es un instrumento que basa su acción en la variación de flotabilidad que sufre un cuerpo cuando es sumergido en soluciones de diferente densidad. Mediante tablas esta densidad puede ser relacionada con el contenido de alcohol y expresarse entonces como porcentaje o grado Gay-Lussac (°GL). Este instrumento debe ser manejado bajo ciertos parámetros de temperatura para poder obtener de ellos una lectura adecuada.

2.6.2. Medición de la densidad utilizando un alcoholímetro

Esta medición tiene el mismo fundamento que al utilizar el hidrómetro, la diferencia es que no es necesario utilizar las tablas porque su escala expresa directamente el contenido de alcohol (Herrera, Bolaños, & Lutz, 2003).

2.6.3. Medición del punto de ebullición

Según Grosch & Schieberle (1997), Esta medición se fundamenta en el cambio del punto de ebullición de la muestra destilada con referencia a una muestra blanco. La diferencia en el punto de ebullición es proporcional a la cantidad etanol.

2.6.4. Medición por el método de Refractometría

Este método calcula el índice de refracción de etanol (propiedad física fundamental de cualquier sustancia) que permite medir su composición o pureza. Los refractómetros son empleados para determinar este índice de refracción, el cual es el cociente de la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad de la luz en el medio cuyo índice se calcula.

El índice de refracción es dependiente de la temperatura y es característico de cada sustancia en particular. El índice de refracción es usualmente reportado a una temperatura de 20 grados Celsius. (Skoog *et al.*, 2003).



Figura 7. Refractómetro. Fuente: Skoog *et al.*, 2003

2.6.5. Medición por el método cromatográfico

Este método se fundamenta en aprovechar la volatilidad del etanol para identificarlo y cuantificarlo en la muestra. Según Winekb *et al.* (1996) la medición se puede realizar en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionización de la flama (GC/FID) o en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas (GC/MS).

2.6.6. Medición por el método enzimático

Este método se fundamenta en la oxidación del etanol hasta acetaldehído, utilizando la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), y la coenzima dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidada (NAD⁺) (Fig. 8). La relación entre NAD⁺ y NADH se mide utilizando un instrumento espectrofotométrico a 334, 340 o 360 nm para relacionarlo con la cantidad de etanol. Dependiendo de la longitud de onda que se elija, se debe tener la precaución de que la concentración de etanol sea de 0,01 a 0,12g/l (365 nm) o de 0,005 a 0,06g/l (340o334nm). (Atkins & Jones, 2012).

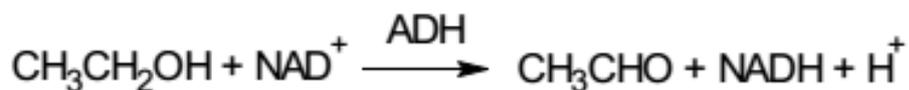


Figura 8. Reacción enzimática del etanol. Fuente: Atkins & Jones, 2012

2.7. ETANOL COMO BIOCOMBUSTIBLE

2.7.1. Características generales del etanol

El etanol o alcohol etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) es una cadena de dos átomos de carbono unidos por un enlace simple, donde uno de éstos está enlazado a un grupo hidroxilo; producto de una fermentación anaeróbica de azúcares por medio de microorganismos, principalmente la levadura *S. cerevisiae* (Pezoa, 2010). Bajo condiciones ordinarias, el etanol es volátil, inflamable, se encuentra en estado líquido, incoloro, miscible en agua y en solventes no polares, su temperatura de ebullición normal es $78,65\text{ }^\circ\text{C}$ y su calor de vaporización es $38,56\text{ kJ/mol}$. (Cortínez, 2010).

El bioetanol es un biocombustible de origen vegetal que se produce a partir de la fermentación de materia orgánica rica en azúcar (caña de azúcar, remolacha, cereales, maíz, etc), así como de la transformación en azúcar del almidón presente en los cereales. La producción de bioetanol se basa en un proceso bien conocido: la fermentación alcohólica. En la fermentación alcohólica, que llevan a cabo las levaduras, el producto final resultante es el etanol y, en menor proporción otro alcohol, butanodiol (Galvis, 2009).

2.7.2. Aplicaciones del etanol

Actualmente países como Colombia, Brasil, EE. UU y Perú emplean el etanol como un aditivo de la gasolina convencional. Aunque niveles bajos de etanol (del 3 al 22% de etanol) no requieren modificación alguna del motor de gasolina, altos niveles en la mezcla, (del 85% y 95% de etanol), exigen la construcción de motores específicamente diseñados para tales combustibles (Escalante & Fuentes, 2013).

2.7.3. Bioetanol de segunda generación

Se llama biocombustibles de segunda generación a los que se obtienen de otras fuentes naturales alternativas, como lo es, la biomasa lignocelulósica, es decir, un componente esencial de la madera que incluye residuos forestales y agroindustriales, puede ser una de las más adecuadas. La producción de etanol a partir de este tipo de biomasa presenta algunas ventajas medioambientales respecto de la producción de etanol por fermentación de azúcares. Sin embargo, el grado de comercialización de este etanol de segunda generación es todavía lento.

2.7.4. Ventajas de bioetanol de segunda generación

Se considera en general que los biocombustibles ofrecen muchas ventajas, tales como la sostenibilidad e impacto ambiental favorable al reducir la concentración de gases de efecto invernadero. El etanol producido a partir de cultivos agrícolas, “bioetanol” es de gran interés a causa de la naturaleza renovables de sus materias primas. (Galvis, 2009). Es una fuente más limpia de combustibles ya que al ser mezclado con gasolina aumenta el octanaje promoviendo una mejor combustión y por lo tanto reduce la necesidad de incorporar aditivos altamente tóxicos como el benceno (Sanchez & Cardona, 2005).

Produce menos dióxido de carbono que la gasolina; aunque, el impacto total depende de los procesos de destilación y la eficiencia de los cultivos. Presenta un elevado número de octano (105). Presenta baja toxicidad en comparación con los hidrocarburos. No contiene azufre, por tanto, no emite SO_x en la combustión. Y La combinación de 90% de gasolina y 10% bioetanol puede ser usado en los vehículos sin ninguna modificación en el motor (Melo *et al.*, 2012).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

En este estudio, se aplicó la metodología de superficie de respuesta (MSR) utilizando un diseño completo central rotacional (DCCR), para optimizar las condiciones con dos variables independientes (Temperatura y concentración de ácido sulfúrico) y como variable dependiente: Concentración de bioetanol (g/L).

Se realizó un planeamiento factorial completo 2^k (+1, -1), cuatro puntos axiales (+1.41, -1.41), tres puntos centrales (0, 0), lo cual generó la matriz del diseño experimental con 11 tratamientos (ver tabla 7) . El exponencial k representa el número de variables independientes (k=2) Temperatura y concentración de ácido sulfúrico.

La ecuación matemática codificada del modelo cuadrático de segundo orden estudiado se expresó de la siguiente manera:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (1)$$

Donde Y es la variable dependiente, X_1 y X_2 representa las variables independientes, en forma codificada: β_0 , β_1 , β_2 , β_{11} , β_{22} y β_{12} son los coeficientes de regresión estimados a partir de los datos experimentales.

En la tabla 6 se muestran los valores mínimos (-) y máximos (+) de las variables Temperatura en la hidrólisis ácida y concentración de ácido sulfúrico.

Tabla 6. Codificación de los valores usados en DCCR para dos variables.

Variabales	-1.41	-1	0	+1	+1.41
Temperatura (°C)	91.72	100	120	140	148.28
Concentración de ácido sulfúrico (% v/v)	2.17	3	5	7	7.83

FUENTE: Propia

Tabla 7. Diseño experimental según DCCR para 2 variables.

Tratamiento	Codificación		Valores reales		Respuesta
	X ₁	X ₂	Temperatura (°C)	Concentración de ácido sulfúrico (% v/v)	Concentración de bioetanol (g/L)
1	-1	-1	100	3	
2	-1	1	100	7	
3	1	-1	140	3	
4	1	1	140	7	
5	- α	0	91.72	5	
6	α	0	148.28	5	
7	0	- α	120	2.17	
8	0	α	120	7.83	
9	0	0	120	5	
10	0	0	120	5	
11	0	0	120	5	

FUENTE: Propia

Dónde:

X₁= Temperatura en la hidrólisis ácida (°C)**X₂**= Concentración de ácido sulfúrico (% v/v)

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1. Población

Cultivares de banano de la variedad *M. cavendish*.

3.2.2. Muestra

Raquis del banano de la variedad *M. cavendish*.

3.2.3. Unidad de análisis

Material lignocelulósico de raquis del banano de la variedad *M. cavendish* obtenido de la sección de fruta del mercado La Perla del Departamento de Ancash, Provincia del Santa, distrito de Chimbote.

3.2.4. Material biológico

Raquis del banano de la variedad *M. cavendish* obtenido de la sección de fruta del mercado La Perla del departamento de Ancash, provincia del Santa, distrito de Chimbote. La selección se realizó teniendo en cuenta las características sensoriales y alteración microbiológica, presencia de manchas oscuras o con signos de putrefacción (Fig. 9).



Raquis de
banano

Figura 9. Raquis de banano de la variedad *Musa cavendish* del departamento de Ancash, provincia del Santa, distrito de Chimbote.

3.3. CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL

La materia prima se caracterizó para determinar el % de humedad, % de materia seca, % de celulosa, % de hemicelulosa, % de lignina, % de cenizas y de azúcares reductores presentes. Se realizó la caracterización química en cuanto a:

3.3.1. Determinación de porcentaje de humedad y porcentaje de materia seca

La determinación del porcentaje de humedad expresado como %H y porcentaje de materia seca expresado como %Ms se realizaron mediante el método AOAC 1990/964.22 (ver Anexo 1).

3.3.2. Porcentaje de celulosa

El contenido porcentual de celulosa se determinó mediante el método de Kûrshner - Höffer, los materiales libres de sustancias extraíbles se le añadieron 25 mL de mezcla reactiva de HNO₃ – etanol (1:4); se colocaron a reflujo en baño de agua durante una hora, se decantaron y se añadieron una nueva cantidad de mezcla reactiva, repitiendo esta operación tres veces. Posteriormente se añadieron 25 mL de KOH al 1% durante 30 minutos, se filtró y los sólidos se secaron.

3.3.3. Porcentaje de lignina

El contenido de lignina insoluble en ácido se realizó en las muestras libres de sustancias extraíbles. Las muestras se mezclaron con 15 mL de ácido sulfúrico al 72% v/v, se agitó con frecuencia a 15 °C durante 2 horas. Las mezclas se diluyeron con agua destilada, se colocaron a reflujo durante 4 horas, se filtraron, y los residuos se secaron hasta masa constante, según el método de Klason descrita por Núñez (2008).

3.3.4. Porcentaje de ceniza

La determinación del porcentaje de cenizas se realizó mediante el método: Mufla (AOAC, 1990). Se pre-pesó un crisol con 5 ml de HNO₃ y 2 g de raquis de banano (P₁), se calentó el material hasta formar carbón, la muestra se colocó en un horno de mufla durante 6 horas a 555 °C y luego se pesó (P₂).

3.4. ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

El raquis de *M. cavendish* se lavó minuciosamente con abundante agua para eliminar la tierra presente, se desinfectó en una solución de hipoclorito de sodio al 5% v/v por 10 minutos, posteriormente se cortó en trozos pequeños para facilitar el pretratamiento mecánico (Fig. 10).



Figura 10. Limpieza y desinfección del raquis de *M. cavendish*. (A) Lavado de raquis con agua e hipoclorito de sodio al 5% v/v. (B) Secado de raquis. (C) Corte de raquis en trozos de 5 cm.

Posteriormente se realizó el proceso de trituración con una licuadora, con el objetivo de contribuir a una más fácil degradación de la muestra durante los pretratamientos de hidrólisis acida para la obtención de azúcares reductores (Fig. 11).



Figura 11. Tratamiento mecánico (trituración) de las muestras de raquis.

3.5. PRETRATAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA

Para la obtención de bioetanol es necesario un pre tratamiento que haga que la estructura del material lignocelulósico sea accesible para conseguir la liberación de las cadenas de azúcares. En este trabajo se empleó la hidrólisis ácida diluida.

3.5.1. Hidrólisis ácida diluida

La hidrólisis ácida se llevó a cabo con diferentes concentraciones de ácido sulfúrico y temperatura mediante el diseño experimental (Fig.12).



Figura 12. Preparación de ácido sulfúrico diluido a diferentes concentraciones.

Se pesaron muestras de 50 g de raquis de *M. cavendish*, posteriormente se adicionó 100 mL de ácido sulfúrico (2.17, 3, 5, 7 y 7.83% v/v) en un vaso precipitado de 250 mL, llevando a una autoclave a diferentes temperaturas (91.72, 100, 120, 140 y 148.28°C) a una presión de 15 psi, durante 120 minutos.

Luego de la hidrólisis los zumos obtenidos se separaron mediante filtración utilizando un embudo de vidrio para separar las partículas pequeñas usando como medio filtrante papel filtro Wattman 40, logrando obtener un jarabe libre de material particulado (Fig. 13).

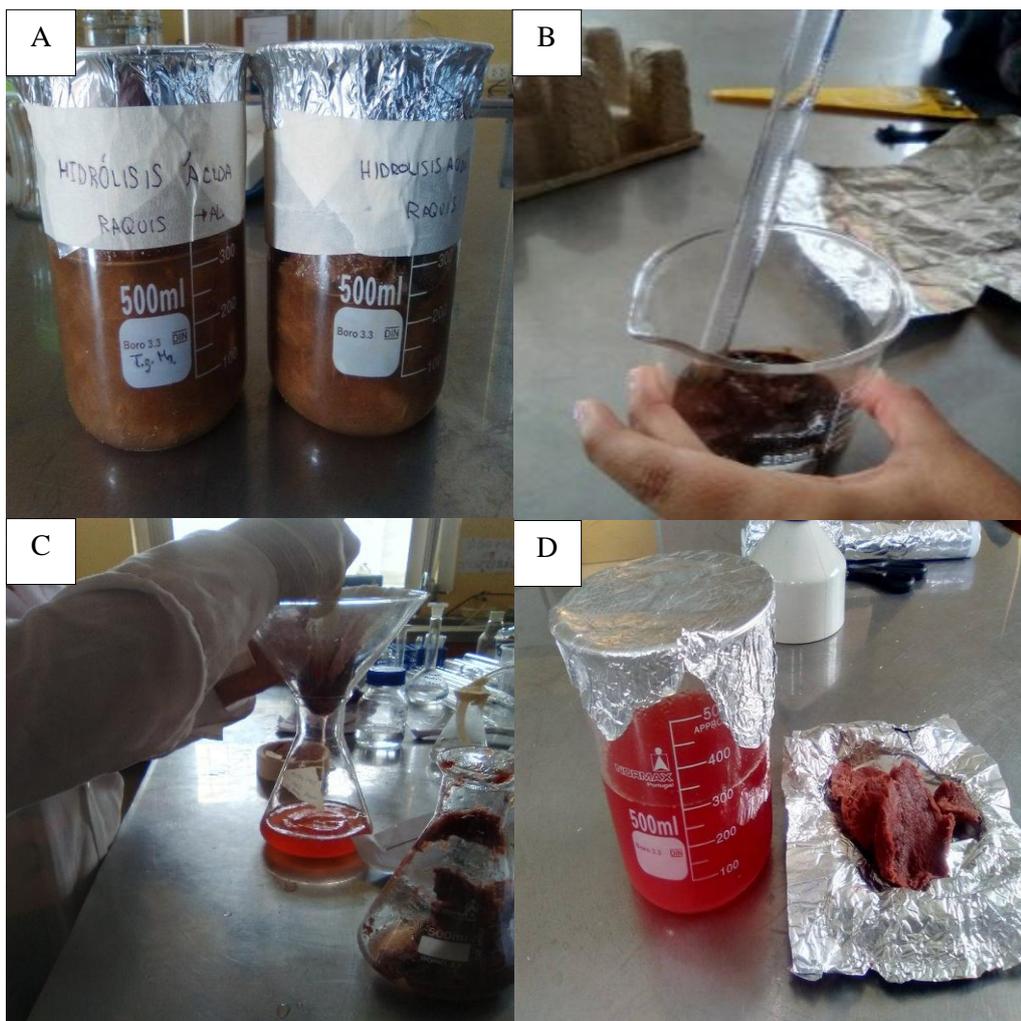


Figura 13. Hidrólisis ácida diluida del raquis de *M. cavendish*. (A) Muestra triturada. (B) Distribución del ácido sulfúrico a diferentes concentraciones en un vaso precipitado. (C) Filtración de la muestra hidrolizada mediante papel filtro Wattman 40. (D) Muestra hidrolizada.

Se determinó la concentración de azúcares reductores utilizando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y la concentración de glucosa utilizando el kit Glicemia enzimática AA (Weimar lab.) en las muestras hidrolizadas. Posteriormente se dejó en refrigeración a 8°C, para la posterior utilización.

3.6. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES MEDIANTE EL METODO DE MILLER

3.6.1. Preparación de la curva de calibración de azúcares reductores

Se determinó la curva de calibración para azúcares reductores mediante el método de DNS a una absorbancia de 540 nm. Este método fue usado para evaluar las concentraciones de azúcares reductores de los diferentes tratamientos (ver Anexo 2).

3.6.2. Concentraciones de azúcares reductores de la muestra hidrolizada

Se determinó el contenido de azúcares reductores de las muestras del hidrolizado, ajustando el pH de 4 a 5 con NaOH 10N mediante un potenciómetro y luego las muestras hidrolizadas se separaron de los componentes que precipitaron, por centrifugación a 15000 rpm durante 5 min. Se realizó el método de DNS y se llevó a leer las absorbancias de las muestras a 540 nm en un espectrofotómetro (Fig. 14).

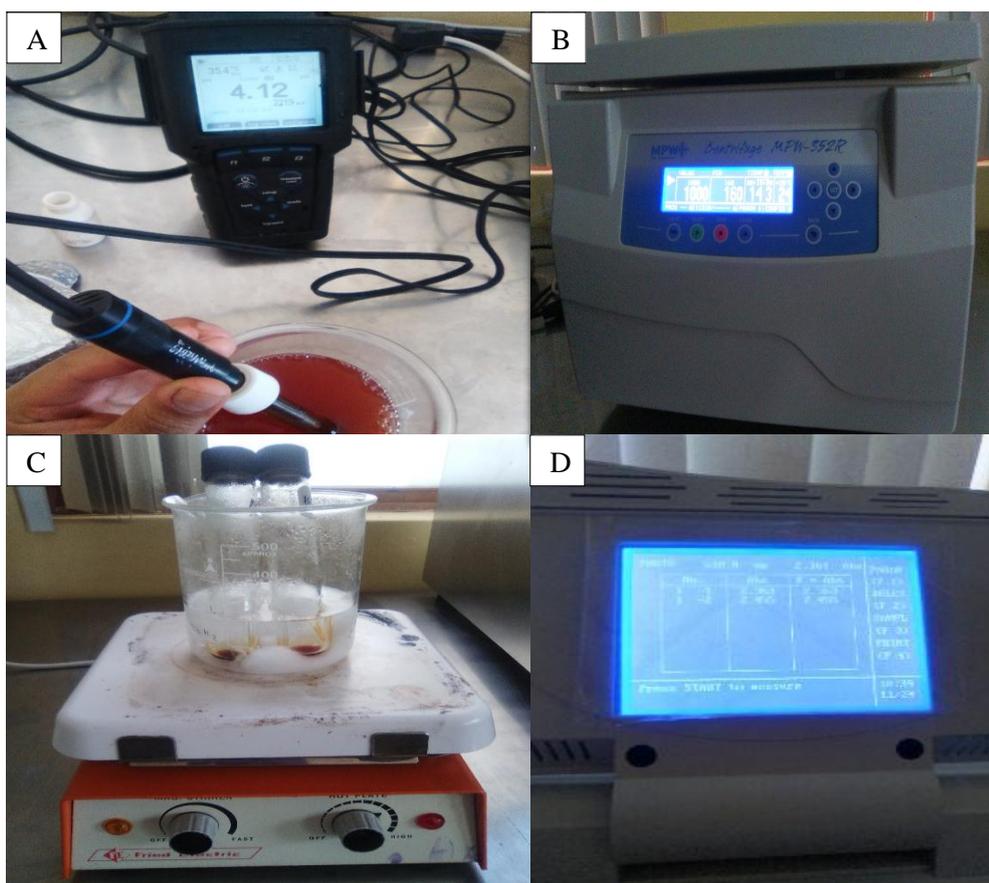


Figura 14. Determinación de azucares reductores de la muestra hidrolizada. (A) Ajuste de pH mediante un potenciómetro. (B) Centrifugación de la muestra hidrolizada (C) DNS. (D) Lectura de las muestras hidrolizadas a 540 nm.

3.7. DETERMINACIÓN DEL GLUCOSA POR KIT ENZIMATICO

3.7.1. Preparación de la curva de calibración de glucosa

Se determinó la curva de calibración mediante el método enzimático utilizando el kit Glicemia enzimática AA (Weimar lab.). Este método fue usado para evaluar las concentraciones de glucosa (g/L) presente en los diferentes tratamientos, ver Anexo 3.

3.7.2. Determinación de las concentraciones de glucosa de los diferentes tratamientos

Se tomaron 5 µl de cada muestra centrifugada y 0.5 ml de solución enzimática en tubos eppendorf llevándolo a agitación. Después se incubó las muestras durante 5 minutos en baño maría a 37°C, transcurrido el tiempo se procedió a leer en espectrofotómetro a 505 nm como longitud de onda y se calculó la concentración de glucosa presente en los tubos a partir de la ecuación de la curva de calibración (Fig. 15).

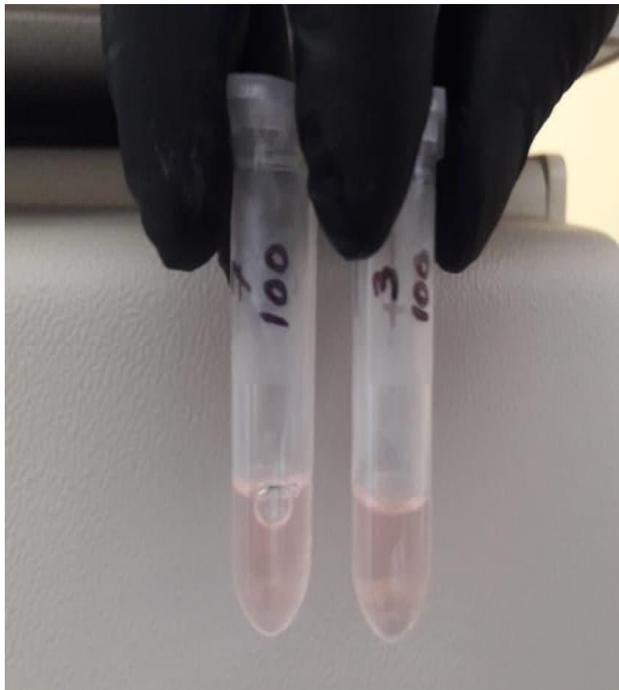


Figura 15. Determinación de la concentración de glucosa (g/L) mediante kit Glicemia enzimática AA (Weimar lab.).

3.8. PREPARACIÓN DEL INOCULO DE LEVADURA

En el proceso de fermentación el microorganismo utilizado fue *S. cerevisiae* ATCC 4126, la cual fue cultivada asépticamente en medio de levadura (YM).

El inculo de levadura se cultivó asépticamente en un matraz Erlenmeyer que contenía 250 mL de medio de levadura (YM) (1.2 g/L de extracto de levadura, 6 g/L de extracto de malta, 6 g/L de dextrosa), los volúmenes de cada componente se muestran en la tabla 8. La temperatura fue 30°C y velocidad de agitación de 150 rpm, durante 72 horas.

Luego de 3 días se observó el crecimiento del microorganismo en el matraz. Posteriormente, se preservó la levadura *S. cerevisiae* ATCC 4126 en viales contenidas medios solidos YM adicionando 5 g/L de agar, y se dejó incubar por tres días en una incubadora a 28°C, finalizado el tiempo se conservó en una refrigeradora a 4°C hasta su posterior utilización (ver Anexo 4).

Tabla 8. Componentes para el medio de levadura *S. cerevisiae* ATCC 4126.

Componentes	Para 100 ml	Para 20 ml
Extracto de malta	0.6 g	0.12 g
Extracto de levadura	0.12 g	0.024 g
Dextrosa	0.6 g	0.12 g
Agarosa	0.0 g	0.1 g

FUENTE: Propia

3.8.1. Activación de *S. cerevisiae* ATCC 4126

Se tomó una muestra de 25 mL de la mezcla hidrolizada (sólo parte líquida), la cual se sometió a evaporación en la estufa a 125 °C por 2 horas, con el objetivo de elevar la concentración de azúcares necesaria para la activación de la levadura para el proceso de fermentación.

3.9. FERMENTACIÓN

Después de la hidrólisis, se ajustó el pH a 4,5 – 5,0 con NaOH 10 N mediante un potenciómetro (Fig.16). Como nutrientes se utilizó sulfato de amonio, extracto de levadura, sulfato de magnesio, y como fuente de carbono se utilizó la muestra hidrolizada (ver Tabla 9). Luego se inoculó con 0,1 % p/v de levadura *S. cerevisiae* ATCC 4126 disuelta en un poco del zumo hidrolizado como lo reportan (Cuadrado, 2006).



Figura 16. Ajuste de pH del medio hidrolizado del raquis.

La fermentación se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 mL con un volumen efectivo de trabajo de aproximadamente 100 mL en anaerobiosis a 28°C según Rodríguez & Zambrano (2011), se controló el pH y la temperatura de la fermentación alcohólica, por un tiempo de 72 horas. Se midió diariamente el grado Brix hasta dar por concluido el proceso, tiempo en el que el grado Brix disminuye hasta alcanzar un valor constante (ver Anexo 5).

Tabla 9. Componentes para el medio de fermentación.

Componentes	Concentración (g/L)	Cantidad para 100 mL
Sulfato de amonio	0.96	0.096 g
Extracto de levadura	6.5	0.65 g
Sulfato de magnesio	0.5	0.05 g
Mezcla hidrolizada	3.75 – 4.57	0.37 – 0.46 g

FUENTE: Propia

3.10. DESTILACIÓN DE LA MUESTRA FERMENTADA

La destilación se llevó a cabo en un rotavapor, en la tabla 10 se menciona las condiciones para la destilación del medio fermentado. Se lavó cuidadosamente el equipo para destilación con agua destilada y se procedió a armarlo.

Tabla 10. Condiciones para el proceso de destilación del medio fermentado.

Parámetros	Unidad de medida	Valores
Temperatura	° C	70
Presión	mbar	196
Tiempo	h	2
Rotación	rpm	30

FUENTE: Propia

Luego se agregó 100 mL del medio fermentado al matraz. Se midió la temperatura a la cual empieza a destilar el líquido y recibir el destilado hasta antes de que la temperatura llegue a ser constante. Al permanecer constante la temperatura, se cambiará inmediatamente el matraz receptor para recibir ahora todo lo que destile a esa temperatura. Al modificarse la temperatura de nuevo, se cambiará el matraz y se recolectará lo que destile a la nueva temperatura (Fig. 17). Se medirá continuamente la temperatura de destilación, procurando que no sobrepase los 78 °C (punto de ebullición del alcohol etílico).



Figura 17. Destilación del medio fermentado mediante un rotavapor.

3.11. DETERMINACIÓN DEL BIOETANOL POR MÉTODO DE REFRACTOMETRÍA

3.11.1. Preparación de la curva de calibración para las concentraciones de bioetanol (g/L)

Se determinó la curva de calibración mediante el método de Refractometría. Este método fue usado para evaluar las concentraciones de bioetanol (g/L) presente en los diferentes tratamientos, ver Anexo 6.

3.11.2. Determinación de las concentraciones de bioetanol de los diferentes tratamientos

Se tomaron muestras de cada uno de los destilados y se les midió el índice de refracción con un refractómetro RFM300-M, las medidas fueron tomadas a una temperatura de 26 °C. A partir de la ecuación de la curva de calibración se calculó la concentración de bioetanol presente en los destilados (Fig. 18).



Figura 18. Concentraciones de bioetanol (g/L) de los tratamientos mediante el método de Refractometría.

3.12. DETERMINACIÓN DE RENDIMIENTO DE BIOETANOL

En el proceso de fermentación se consideran dos rendimientos importantes: $Y_{x/s}$ que expresa la cantidad de biomasa producida a partir del sustrato consumido, este rendimiento se ve afectado por variables como la composición del medio, la naturaleza de las fuentes de carbono y nitrógeno, el pH, la temperatura; el rendimiento del producto a partir del sustrato $Y_{p/s}$, es económicamente el más importante.

Se evaluó el rendimiento de producto a partir de la cantidad de sustrato, los datos tomados fueron de los promedios de las concentraciones de azúcares reductores (g/L) y concentraciones de bioetanol (g/L) por cada tratamiento.

Se calculó $Y_{p/s}$ mediante la siguiente fórmula:

$$Y_{p/s} = \frac{\text{Producto formado (bioetanol)}}{\text{Consumo de sustrato}} * 100$$

En este trabajo sólo se evaluó el rendimiento de producto a partir de la cantidad de sustrato (ver Anexo 7).

3.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó la prueba estadística ANOVA con un nivel de confiabilidad de 95% para determinar la relación entre la interacción de las variables independientes (Temperatura y concentración de ácido sulfúrico) y su impacto en la variable respuesta: Concentración de bioetanol (g/L). Para lo cual se empleó el programa STATISTICA versión 10. El cual permite optimizar estadísticamente el proceso a través del diseño completo central rotacional (DCCR).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL RAQUIS

Los resultados de la composición química del raquis de banano de *M. cavendish* en base seca se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Caracterización química del raquis de *M. cavendish* en base seca.

Componente	Raquis (% en base seca)
Humedad	6.58 %
Cenizas	11.4 %
Celulosa	32.60 %
Lignina	9.85 %

Los resultados reportaron que la celulosa es la fracción mayoritaria de la fibra del raquis de banano de *M. cavendish* con un valor de 32.60%, sabiendo que mediante la hidrólisis ácida de la celulosa se obtiene monosacáridos como glucosa la cual sirve como fuente de carbono para *S. cerevisiae* ATCC 4126 y en la conversión a etanol (Castillo, 2005). Cabe recalcar que estos resultados se mantienen en el rango de valores reportados por Santa María *et al.* (2013), quienes reportan un valor de $31.02 \pm 0,69$ % cercano al determinado en el presente estudio.

Los contenidos de celulosa difieren dependiendo de la parte anatómica del banano de *M. cavendish* que se elige para la producción de bioetanol como lo reporta Monsalve *et al.* (2006) quienes caracterizaron la cáscara de banano con un 13.2% de celulosa, valores inferiores a este estudio debido a la parte anatómica de la planta que se estudia. El análisis de la composición química del raquis es un punto importante en esta investigación, porque de ello depende el tipo de pretratamiento que se aplicó y las condiciones determinadas del proceso para provocar la exposición y libre acceso de la celulosa para la obtención de la mayor concentración de azúcares fermentables (Cevallos & Chariguaman, 2016).

En cuanto al contenido de lignina el raquis presenta un valor de 9,85%, Según Wyman, C. (1996), la lignina es la que restringe el acceso a la celulosa, por lo que fue necesario una etapa de pretratamiento previa a la hidrolisis, con el propósito de alterar la estructura del material lignocelulósico.

El aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos como el raquis de *M. cavendish* depende de sus propiedades fisicoquímicas, bioquímicas y energéticas del residuo Castillo (2005). Los datos reportados en este trabajo de investigación indican que el contenido de celulosa y lignina del raquis se encuentran en un rango aceptable para su conversión a azúcares para la fermentación a bioetanol, sabiendo que estos componentes constituyen una fuente de glucosa prácticamente inagotable convirtiendo a este residuo lignocelulósico útil como materia prima en la obtención de glucosa mediante hidrolisis que, utilizada en las industrias de fermentaciones, permite obtener una gran gama de productos como el bioetanol de uso como combustible. Por otro lado, Bastidas (2013) menciona que se debe tener en cuenta que la celulosa es una fibra vegetal cuya composición, longitud y espesor varía según el tipo, origen, la parte anatómica y la madurez de la planta.

4.2. EFECTO DE LOS PARÁMETROS DE PRETRATAMIENTO EN LOS AZÚCARES REDUCTORES

Las concentraciones de los azúcares reductores del raquis de *M. cavendish*, sometido a diferentes tratamientos de temperaturas y concentraciones de ácido sulfúrico en la hidrólisis ácida se muestran la tabla 12.

Tabla 12. Concentraciones de azúcares reductores obtenidos en la hidrólisis ácida en los pretratamientos.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Ácido sulfúrico (% v/v)	Después del pretratamiento		En la fermentación	
			Glucosa (g/L)	AR (g/L)	Glucosa (g/L)	AR (g/L)
1	100.00	3.00	4.65	10.07	5.95	11.63
2	100.00	7.00	9.35	12.68	10.65	14.24
3	140.00	3.00	6.76	11.42	8.06	12.98
4	140.00	7.00	6.48	11.98	7.98	13.54
5	91.72	5.00	8.41	10.00	9.76	11.56
6	148.28	5.00	6.98	10.83	8.68	12.39
7	120.00	2.17	5.59	8.60	7.29	10.16
8	120.00	7.83	11.79	15.13	14.78	16.69
9	120.00	5.00	13.49	17.02	15.47	18.88
10	120.00	5.00	13.51	17.03	15.49	18.89
11	120.00	5.00	13.54	17.04	15.52	18.90

En la tabla 12 se evidencia que el tratamiento 11 de hidrólisis ácida (120°C y 5% de H₂SO₄), presentó el mayor contenido de glucosa de 15.52g/L y azúcares reductores de 18.90 g/L. De acuerdo a lo reportado por Oliva (2003), los procesos de hidrólisis ácida alcanzan mayores concentraciones de azúcares reductores cuando se emplean altas temperaturas y concentraciones de ácidos. Sin embargo en este trabajo de investigación se obtuvo mayor concentración de azúcares cuando se empleó los valores centrales del diseño experimental (120°C y 5% de H₂SO₄), debido a que la hidrólisis ácida de biomasa lignocelulósica con alta concentración de ácido provoca

que los azúcares obtenidos se puedan descomponer en inhibidores fermentativos como 5-HMF, furfural, ácido fórmico y ácido acético (Narendra *et al.*, 2017).

Así mismo los datos experimentales comprueban que la temperatura es la variable que influye sobre el efecto catalítico del ácido sulfúrico en los diferentes tratamientos estudiados en el presente trabajo. Esto se evidencia entre el tratamiento 5, 6 y 11 con las mismas concentraciones de H₂SO₄ de 5% y diferentes temperaturas de 91.72, 148.28 y 120°C respectivamente donde el tratamiento 11 (5% de H₂SO₄ y 120°C) presenta una mayor concentración de azúcares reductores de 18.90 g/L, a pesar de que el tratamiento 6 presenta la temperatura más alta (148.28°C). Debido a que el ácido sulfúrico actúa como un catalizador para romper los enlaces glicosídicos presentes en los carbohidratos poliméricos y el efecto catalítico de este aumenta con un aumento de la temperatura, disminuyendo la cantidad de azúcares debido a su descomposición, puesto que, se reporta que la xilosa se puede degradar fácilmente a furfural a una temperatura superior de 120 ° C (Abril, 2016).

Esto concuerda con los autores como Cevallos y Chariguaman (2016) que evaluaron el efecto de las temperaturas y concentraciones de ácido sulfúrico diluido en la producción de azúcares durante el pretratamiento de rastrojos de maíz y los resultados que obtuvieron muestran que las concentraciones de azúcares reductores incrementan al aumentar la temperatura. Como resultado, en el presente trabajo el 32.60 % de celulosa se convierte en 15.49g/L de glucosa en condiciones de (120°C y 5% de H₂SO₄) demostrando que en el proceso de hidrólisis ácida no solo la temperatura es un parámetro influyente; sino también la concentración de ácido sulfúrico. Abril (2016) en su trabajo de investigación de optimización de la reacción de hidrólisis ácida de los residuos de la planta del banano, para mayor rendimiento a glucosa reportaron concentraciones de azúcares reductores de 1.29 g/L, 2.71 g/L y 2.18 g/L a partir de raquis de *Musa acuminata*, concluyendo que los azúcares reductores varía dependiendo de la especie y tipos de residuos de banano. En otro estudio se sometió al raquis de palma africana (*Elaeis guineensis*) a diferentes pretratamientos con hidrólisis ácida, alcalina y enzimática obteniendo una concentración de azúcares reductores de 20 g/L), demostrando los diferentes tipos de pretratamientos, al cual es sometido el material lignocelulósico permite la obtención de mayor concentración de azúcares reductores (Bastidas, 2013).

4.3. EFECTO DE LOS PARÁMETROS DE PRETRATAMIENTO EN LAS CONCENTRACIONES DE BIOETANOL

En la tabla 13, se muestran las concentraciones de bioetanol obtenidos de la destilación de las muestras fermentadas del raquis de *M. cavendish*, el cual fue sometido a diferentes tratamientos de temperatura y concentración de ácido sulfúrico en el proceso de hidrólisis ácida.

Tabla 13. Concentraciones de bioetanol obtenidas en la destilación de los diferentes tratamientos.

Tratamientos	Temperatura (°C)	Ácido sulfúrico (% v/v)	Concentraciones de bioetanol (g/L)
1	100.00	3.00	1.50
2	100.00	7.00	5.80
3	140.00	3.00	3.60
4	140.00	7.00	1.30
5	91.72	5.00	5.20
6	148.28	5.00	0.85
7	120.00	2.17	3.90
8	120.00	7.83	7.30
9	120.00	5.00	8.80
10	120.00	5.00	8.90
11	120.00	5.00	9.00

Las concentraciones de bioetanol obtenidas de los diferentes tratamientos de hidrólisis ácida presentado en la tabla 13, oscilan en el rango de 0.85 g/L a 9 g/L a partir de la determinación por el método de refractometría. Donde el tratamiento 11 (120°C y 5% de H₂SO₄) presenta la mayor concentración de bioetanol de 9 g/L. Según los resultados obtenidos en este trabajo, las mayores concentraciones de bioetanol se reportan en los valores centrales del diseño experimental con temperatura de 120°C y concentración de ácido 5% debido a las bajas concentraciones de inhibidores fermentativos en los prehidrolizados.

Los tratamientos 1 (100°C y 3%) y 6 (148.28°C y 5%) a pesar de haber presentado valores considerables de azúcares reductores, reportaron las menores concentraciones de bioetanol. Debido a que por sus altas temperaturas la producción de 5-HMF fue mayor y provocó efectos negativos en la actividad de *S. cerevisiae* (Monsalve *et al.*, 2006). Es importante recalcar que la producción de inhibidores en el pretratamiento es un factor crítico para la etapa de fermentación puesto que son compuestos tóxicos potenciales que inhiben el crecimiento microbiano y conducen a un bajo rendimiento de etanol durante la fermentación provocando una desaceleración del metabolismo microbiano. Esto concuerda con lo mencionado por Oliva (2003) en un estudio específico con *S. cerevisiae* donde determinó que a concentraciones altas de 5-hidroximetilfurfural se produjo retardo en el crecimiento celular.

En otro estudio Narendra *et al.* (2017), reportaron que en presencia de una baja concentración de inhibidores fermentativos, se obtuvieron altos rendimientos teórico de etanol durante la fermentación de hidrolizados. En resumen, en este estudio las condiciones del pretratamiento 9,10 y 11 hidrolizaron el raquis de *M. cavendish* significativamente con menos degradación de carbohidratos, por lo tanto bajas concentraciones de inhibidores fermentativos, lo que en última instancia aumentó la eficiencia de la fermentación.

4.4. RENDIMIENTO DE BIOETANOL

En la Tabla 14 se muestra los rendimientos Yp/s obtenido de las cantidades de azúcar reductores, y las concentraciones de bioetanol por cada tratamiento.

Tabla 14. Rendimiento de Bioetanol.

Tratamientos	Temperatura (°C)	Ácido sulfúrico (% v/v)	Bioetanol (g/L)	AR (g/L)	Yp/s
1	100.00	3.00	1.50	11.63	0.13
2	100.00	7.00	5.80	14.24	0.41
3	140.00	3.00	3.60	12.98	0.28
4	140.00	7.00	1.30	13.54	0.10
5	91.72	5.00	5.20	11.56	0.45
6	148.28	5.00	0.85	12.39	0.07
7	120.00	2.17	3.90	10.16	0.38
8	120.00	7.83	7.30	16.69	0.44
9	120.00	5.00	8.80	18.88	0.47
10	120.00	5.00	8.90	18.89	0.47
11	120.00	5.00	9.00	18.90	0.48

AR: Azucares reductores

Los rendimientos Yp/s obtenidos en los diferentes tratamientos de hidrólisis ácida fueron de 0.07 a 0.47 g/g manteniéndose bajo los valores de rendimiento teórico de la fermentación, corroborando la teoría de Boudarel (1984), que menciona que el rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol por 1 g de glucosa. Esta conversión de glucosa a etanol sucede por vía glicolítica Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) la cual oxida la hexosa en dos moléculas de ácido pirúvico, resultando en la formación neta de dos ATP por glucosa y NADH. Teniendo en cuenta que el proceso de fermentación realizado en este trabajo fue en anaerobiosis, el NADH formado por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa fue reoxidado vía fermentación alcohólica en etanol. (Vázquez & Dacosta, 2007).

Los tratamientos 9, 10 y 11 (120°C – 5% v/v de H₂SO₄) presentaron el mayor rendimiento de etanol de 0.47 g/g, a pesar de que las condiciones de hidrólisis ácida no fueron altas en la temperatura y concentración de ácido sulfúrico, mientras que el tratamiento 6 (148.28°C – 5% v/v de H₂SO₄) obtuvo un rendimiento menor de 0.07 g/g a pesar que sus condiciones de temperatura y ácido sulfúrico son mayores en la hidrólisis ácida; esperando una mejor obtención de azúcares reductores en este tratamiento y por ende mayor rendimiento de etanol. Sin embargo, las condiciones altas de temperatura y ácido sulfúrico en este tratamiento generó mayor cantidad de compuestos inhibidores como ácidos alifáticos, fenilpropanos, aldehídos, furánicos entre otros que afectaron el crecimiento celular y el metabolismo fermentativo de *S. cerevisiae* ATCC 4126, pues se conoce que altas concentraciones de furfural ralentizan la producción de etanol al inicio de la fermentación (Narendra *et al.*, 2017).

En otros estudios, Monsalve *et al.* (2006) reportaron rendimientos de etanol menores al del presente trabajo de investigación con Y p/s de 0.39 g/g con tratamientos de hidrólisis ácida llevados a cabo a 125°C y 5% v/v de H₂SO₄ a partir de cáscara de banana y como microorganismo fermentativo *Zymomonas mobilis*. Cabe recalcar que uno de los factores que influyen en la diferencia de los valores de rendimiento de etanol es el tipo de microorganismo utilizado en la fermentación (Taherzadeh *et al.*, 1999). Los valores reportados en el tratamiento 9, 10 y 11 (120°C – 5% v/v de H₂SO₄) de Yp/s 0.47 g/g evidencian que *S. cerevisiae* ATCC 4126 tiene la capacidad de tolerar una amplia variedad de condiciones de estrés y mantener una adecuada actividad fermentativa, lo cual es fundamental para su utilización en la industria.

Si bien es cierto, *S. cerevisiae* ATCC 4126 no es capaz de metabolizar pentosas como xilosa, ribosa y arabinosa, presentes en hidrolizados hemicelulósicos. Otros microorganismos como *S. stipitis* y algunas especies de *Candida* podrían ser utilizados para tal fin pero la productividad y tolerancia al etanol es mucho más baja en comparación con *S. cerevisiae* posiblemente debido a la sensibilidad frente a los inhibidores en el medio (Mustafat, 2011). El parámetro Yp/s fue analizado en el presente trabajo debido a que es el factor más importante en la producción de etanol; ya que afecta a la economía del proceso (Alberts *et al.*, 2011).

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PARÁMETROS DEL PRETRATAMIENTO EN OBTENCIÓN DE BIOETANOL

En el presente trabajo, el diseño completo central rotacional (DCCR), se empleó para determinar la influencia de la temperatura de pretratamiento y la concentración de ácido sulfúrico sobre el rendimiento de bioetanol. Mediante el programa Statistica se obtuvo los valores de R^2 y suma de cuadrados del error que permitió elegir el modelo adecuado para predecir la concentración de bioetanol obtenidos de los pretratamientos. Donde el mejor modelo que correlacionó los datos experimentales de concentración de bioetanol fue el modelo de segundo orden. El elevado valor del coeficiente de determinación (R^2) del modelo seleccionado para predecir la concentración de bioetanol ($R^2 = 0.93$), permitió observar el buen ajuste de los datos experimentales con los predichos (Anexo 8).

El análisis de varianza (ANOVA) demostró que el modelo cuadrático desarrollado para la concentración de bioetanol es significativo, puesto que sus valores de p son inferiores a 0.05. Las variables independientes de los pretratamientos y sus efectos de interacción en la variable dependiente se determinaron mediante los coeficientes de regresión ($R^2 = 0.93$), (ver tabla 15).

Tabla 15. Coeficientes de regresión para la variable de concentración de bioetanol (g/L)

Regr. Coefficients; R-sqr=.93915; MS=1.190635; DV: Bioetanol (g/L)			
Factor	Coefficiente	Error estándar	p
Intercepto	-140.961	19.138	0.00072
Temperatura (°C)(L)	2.105	0.284	0.00071
Temperatura (°C)(Q)	-0.008	0.001	0.00086
Ácido sulfúrico (% v/v)(L)	10.290	2.008	0.00369
Ácido sulfúrico (% v/v)(Q)	-0.491	0.114	0.00785
1L by 2L	-0.041	0.013	0.02927

(L)= Lineal (Q)=Cuadrático

El modelo cuadrático de segundo orden para la concentración de bioetanol (g/L) se expresó de la siguiente manera:

$$\text{Bioetanol (g/L)} = -140.961 + 2.105X_1 + 10.290X_2 - 0.008X_1^2 - 0.491X_2^2 - 0.041X_1X_2$$

Donde X_1 representa la variable temperatura y X_2 la concentración de ácido sulfúrico

Para determinar el efecto de cada factor que influye en el pretratamiento de hidrólisis ácida del raquis de *M. cavendish*, la tabla 15 resume los coeficientes de regresión para la variación de la concentración de bioetanol. La tabla 15, reportó que los coeficientes de regresión Temperatura (L) (+2.105) y concentración de ácido (L) (+10.290) tienen signos positivos, por lo que tanto la temperatura de reacción como la concentración de ácido tienen un efecto positivo en la variación de la concentración de bioetanol.

Los coeficientes de regresión 1L by 2L (que es la interacción de las dos variables temperatura y concentración de ácido = -0.041) presentó un efecto negativo en la variación de la concentración de bioetanol, por lo que es importante tener en cuenta que en el proceso de hidrólisis ácida la combinación de los valores de estas dos variables deben ser elegidas adecuadamente. Esto fue corroborado con los resultados de la tabla 13, donde la interacción con los valores más altos de temperatura (140°C) y concentración ácido (7%) en el tratamiento 4 reportaron bajas concentraciones de bioetanol de 1.30 g/L. Y cuando en la interacción de las variables se disminuyó la temperatura (120°C) y concentración de ácido (2.17%) en el tratamiento 7 se reportó un aumento de la concentración de bioetanol (3.90 g/L) respecto al tratamiento 4, sin embargo la mejor concentración de etanol de 8.90 g/L se obtuvo en los tratamientos 9,10 y 11 cuando la interacción de las dos variables se mantienen en los rangos centrales del diseño experimental de temperatura (120 °C) y ácido sulfúrico (5%).

Además, el aumento de temperatura (temperatura Q = -0.008) y concentración de ácido (Ácido sulfúrico Q = -0.491) reportan un efecto negativo en la variación de la concentración de bioetanol, esto concuerda con los autores Zaafouri *et al.*, (2017) quienes reportaron que al aumentar la temperatura sobre 120°C y concentración de ácido mayores a 3% en el proceso de hidrólisis ácida de *Luffa cylindrica* no solo afectó la obtención de azúcares reductores, sino también el rendimiento de etanol.

Tabla 16. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable de concentración de bioetanol del raquis en la hidrólisis ácida.

ANOVA; Var.:Bioetanol (g/L); R-sqr=.93915; MS Residual=1.190635 DV: Bioetanol (g/L)					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Temperatura (°C)(L)	9.14172	1	9.14172	7.67802	0.03932
Temperatura (°C)(Q)	59.76182	1	59.76182	50.1932	0.00086
(2)Concentración de ácido sulfúrico (% v/v)(L)	5.79416	1	5.79416	4.86645	0.07849
Concentración de ácido sulfúrico (% v/v)(Q)	21.81844	1	21.81844	18.3250	0.00785
1L by 2L	10.89000	1	10.89000	9.14638	0.02927
Error	5.95318	5	1.19064		
Total SS	97.83227	10			

La presente investigación demostró que las variaciones de temperatura en la hidrólisis ácida afectaron significativamente la producción de bioetanol a partir de raquis de *M. cavendish*, donde el aumento de la temperatura disminuye considerablemente las concentraciones de bioetanol. Iranmahboob (2011), reportó que mayores concentración de ácido (5 – 25% v/v) conducen a mayores rendimientos de azúcares y, por lo tanto, mayor concentración de bioetanol; pero debe tenerse en cuenta que estos experimentos fueron conducidos a temperaturas entre 60 y 90° C que son menores a las temperaturas evaluadas en el presente estudio, reduciendo la producción de compuestos inhibidores. Así mismo menciona que, al haber mayor temperatura, la velocidad de catálisis se acelera y el efecto del ácido sulfúrico es más efectivo para liberar la hemicelulosa y degradar la pared de lignina del material lignocelulósico.

Por otro lado el elevado valor del coeficiente de determinación (R^2) del modelo seleccionado para predecir la concentración de bioetanol ($R^2=0.93$) permitió interpretar los resultados mediante gráficos de superficies de respuesta (Fig. 19) como de contorno (Fig. 20). Como se puede apreciar en la figura de superficie de respuesta del valor deseable y figura de contorno, el valor máximo de concentración de bioetanol se encuentra en la región roja, la cual pertenece a la combinación de temperatura de la hidrólisis acida (100 a 135°C) y concentración de ácido sulfúrico (1 a 6 % v/v).

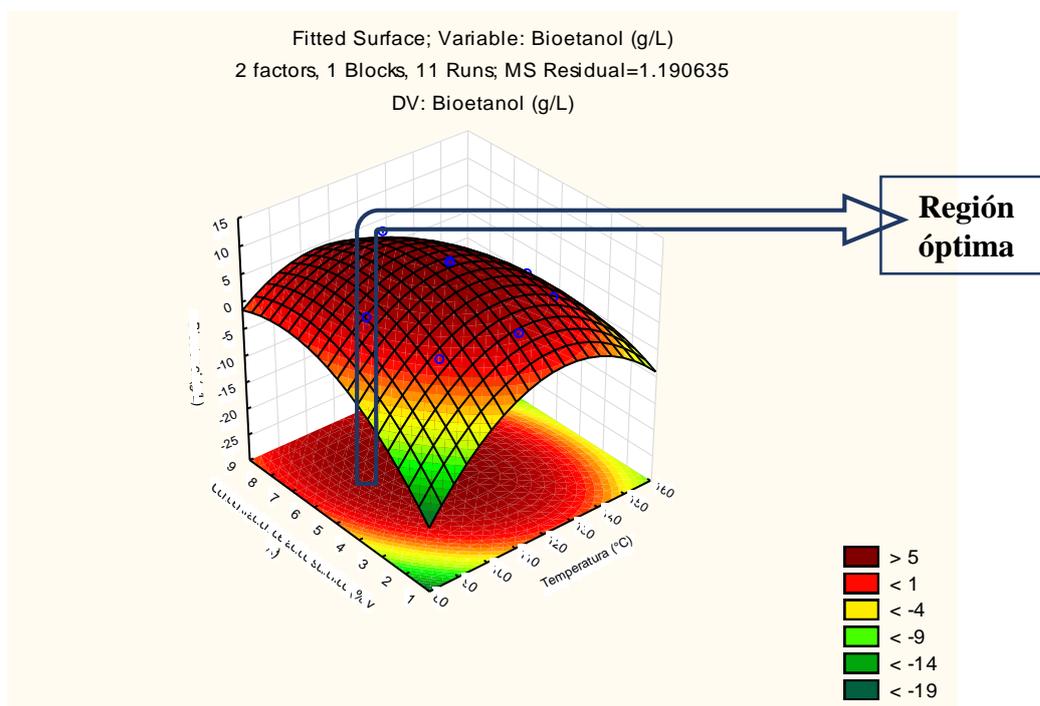


Figura 19. Gráfico de superficie de respuesta de las concentraciones de bioetanol.

Como puede verse en la figura 19, el efecto de la interacción entre los factores (temperatura y concentración de ácido sulfúrico) en la variación de la concentración de etanol confirma que las mejores condiciones de hidrólisis ácida del raquis *M. cavendish* son las siguientes: 120 ° C y 5% v/v H₂SO₄, para alcanzar concentración de bioetanol de 8.90 g /L.

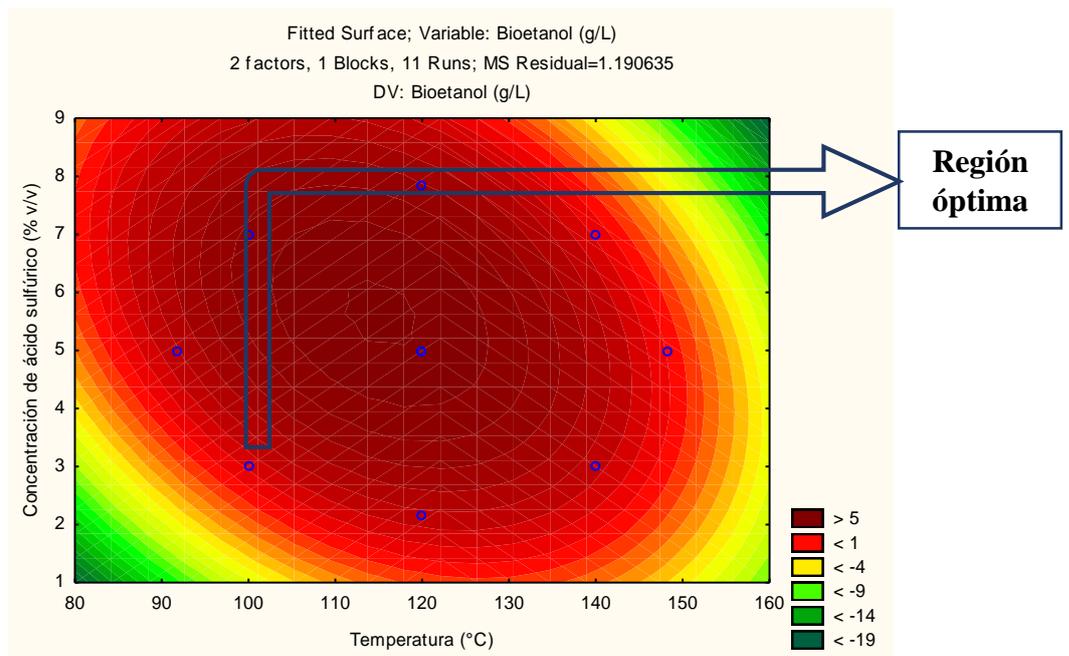


Figura 20. Gráfico de contornos de las concentraciones de bioetanol obtenidas del raquis *M. cavendish*

La superficie de respuesta y los gráficos de contorno ilustraron el efecto de interacción de variables experimentales independientes sobre la concentración de bioetanol. El efecto significativo sobre la variable respuesta se puede observar variando los dos factores temperatura y concentración de ácido a la vez. Estas gráficas son importantes para investigar y comprender los efectos de interacción entre los dos factores en las variables de respuesta.

La Figura 20 muestra la interacción entre la temperatura y la concentración de ácido, donde la concentración de bioetanol aumenta en el centro de la región. Mientras que con un aumento en la concentración de ácido (7% v/v) a alta temperatura (148.28°C), el rendimiento de bioetanol disminuye. Esta disminución de bioetanol puede explicarse por la presencia de inhibidores fermentativos en el medio. Puesto que a esas condiciones los azúcares reductores liberados después del pretratamiento de hidrólisis ácida pueden degradarse o transformarse en compuestos inhibidores debido a las condiciones termoácidas (Narendra *et al.*, 2017).

Así mismo, Larsson *et al.* (2000) Afirmaron que a altas temperaturas y concentraciones de ácido sulfúrico no solo se obtienen mayores concentraciones de azúcares provenientes de la hidrólisis y solubilización de la celulosa y hemicelulosa sino que también se originan otros compuestos como: derivados de furanos, ácidos alifáticos y derivados fenólicos que son potenciales inhibidores de la fermentación disminuyendo la productividad volumétrica y específica de bioetanol. Esto explica los resultados obtenidos en este trabajo donde los tratamientos que se mantienen en condiciones con valores centrales de temperatura (120°C) y concentración de ácido sulfúrico (5% v/v) son los que presentan mejores concentraciones de bioetanol, pues estos tratamientos al ser sometidos a estas condiciones reducen la producción de compuestos inhibidores.

Estos compuestos como es el caso del furfural ejerce un efecto dañino debido a que, al ser un aldehído, es un compuesto químicamente reactivo que puede formar compuestos con moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, produciendo una disminución en la eficiencia de los microorganismos de fermentación (Oliva, 2003).

Otros estudios reportaron que las concentraciones de bioetanol óptimas se encontraron en condiciones de temperatura (121°C) y concentración de ácido sulfúrico (2 - 2,5 % v/v) obteniendo 8.52 g/L de bioetanol (Gámez, 2008). Tejada *et al.* (2011) mencionaron que las condiciones más adecuadas para obtener una mayor concentración de bioetanol fueron de (5% v/v H₂SO₄ y 125°C) obteniendo la mayor concentración de bioetanol de 4.8 g/L estos resultados son inferiores al del presente estudio, debido probablemente a la formación de compuestos inhibidores por las condiciones a las que se llevaron a cabo el proceso de hidrólisis ácida.

El modelo estadístico desarrollado en el software STATISTICA 10 permitió predecir los valores críticos de temperatura y concentración de ácido donde se obtuvo una producción óptima de bioetanol de 9.167 g/L cuando se llevó a cabo la hidrólisis ácida a una concentración de ácido sulfúrico de 5.63 % v/v y temperatura de 115.09°C.

Tabla 17. Valores críticos del análisis en software STATISTICA.

Critical values; Variable: Bioetanol (g/L)			
Solution: maximum			
Predicted value at solution: 9.167045			
Factor	Observed Minimum	Critical Values	Observed Maximum
Temperatura (°C)	91.71573	115.0938	148.2843
Ácido sulfúrico (% v/v)	2.17157	5.6389	7.8284

Los resultados obtenidos después de revalidar estas condiciones de hidrólisis ácida de raquis de *M. cavendish* confirmó la teoría mencionada en el informe donde el ácido sulfúrico actúa como un catalizador para romper los enlaces glicosídicos presentes en los carbohidratos poliméricos y el efecto catalítico de este aumenta con un aumento de la temperatura, disminuyendo la cantidad de azúcares y generando compuestos inhibidores de la fermentación afectando de esta manera el rendimiento de bioetanol, puesto que, se reporta que la xilosa se puede degradar fácilmente a furfural a una temperatura superior de 120 ° C.

Cabe recalcar que las concentraciones de bioetanol reportados en este trabajo (9.167 g/L) en las condiciones óptimas de temperatura (115.09 °C) y concentración de ácido sulfúrico (5.63% v/v) según el modelo estadístico aplicado, presentó valores considerables respecto a otros estudios como los de Gámez (2008) quien en condiciones de temperatura (121°C) y concentración de ácido sulfúrico (2.5% v/v) obtuvo 8.52 g/L de bioetanol. Tejada *et al.* (2011) con condiciones de temperatura (125°C) y concentración de ácido sulfúrico (5 % v/v) obtuvieron 4.8 g/L de bioetanol.

4.6. VALIDACIÓN DE LA RESPUESTA PREVISTA EN LA CONDICIÓN ÓPTIMA

Para validar las respuestas de condición optima predicha, se realizaron experimentos adicionales para examinar la idoneidad de la ecuación modelo. Del estudio experimental, la concentración de bioetanol fue de 9.135 g/L. La condición óptima para la concentración máxima de bioetanol se obtuvo a una temperatura de 115.09°C y a una concentración de ácido sulfúrico 5.63% v/v (ver Tabla 18).

Tabla 18. Resultados de la fermentación del raquis de *M. cavendish*

Glucosa (g/L)	15.60
Azúcares reductores (g/L)	19.03
Bioetanol (g/L)	9.13
Yp/s (g/g)	0.48
Productividad de etanol (g/Lh)	0.30

Los efectos que contribuyen a la disminución de la producción de bioetanol en la fermentación, se han atribuido principalmente a la presencia de una mayor concentración de inhibidores de fermentación, lo que provoca una desaceleración del metabolismo microbiano durante la fermentación con hidrolizado, que finalmente disminuye el rendimiento del bioetanol (Narendra *et al.*, 2017).

Los resultados del estudio actual validaron que este modelo se puede aplicar de manera efectiva en la hidrólisis ácida del raquis *M. cavendish* para la producción de bioetanol con baja concentración de inhibidores. La hidrólisis ácida con una alta concentración de azúcares y la menor concentración de inhibidor de la fermentación puede mejorar la eficiencia de la fermentación durante la producción de productos de origen biológico. Dicho análisis podría ser útil para diseñar un proceso de conversión de biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables para la plataforma de biorefinería de manera tecno-económica

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se determinó las condiciones óptimas de la hidrólisis ácida del raquis *M. cavendish* para la producción de bioetanol, donde los valores predichos obtenidos de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) basado en el Diseño Completo Central Rotacional (DCCR) demostraron una buena concordancia con los datos experimentales. Las condiciones óptimas del pretratamiento fue una temperatura de 115.1 °C y concentración de ácido sulfúrico de 5.63% v/v, las cuales permitieron hidrolizar el raquis *M. cavendish* con una eficiencia de conversión de azúcares reductores (19.3 g/L) y la menor descomposición de los azúcares. La presencia de una baja concentración de inhibidores de fermentación mejoro significativamente la eficiencia de la fermentación del hidrolizado obteniendo una mayor concentración de bioetanol (9.14g/L). Así mismo, se determinó que la temperatura de reacción fue la variable con mayor influencia en la evaluación de proceso de hidrólisis ácida, los resultados de coeficiente de regresión demostró que esta variable tiene un efecto significativo sobre la variación de la concentración de bioetanol. Pues el aumento de la temperatura aumenta el efecto catalítico del ácido sulfúrico para romper los enlaces glicosídicos presentes en los carbohidratos poliméricos.

La caracterización del raquis de banano *Musa cavendish* permitió demostrar que este material lignocelulósico contiene valores considerables de hemicelulosa, celulosa y lignina que con pretratamiento de hidrólisis ácida se obtuvo concentraciones de azúcares reductores considerables para el proceso de fermentación para la obtención de bioetanol. La biotecnología constituye una importante oportunidad para convertir el raquis de banano *Musa cavendish* en una materia prima económicamente beneficiosa y adecuada para la producción sostenible de biocombustible.

5.2. Recomendación

Se recomienda comparar otras técnicas de pretratamiento de la biomasa para la obtención de una mejor concentración de azúcares reductores.

Se recomienda hacer una evaluación de los compuestos inhibitorios como Furfural y 5-hidroximetil furfural (HMF).

Se recomienda neutralizar estos compuestos inhibitorios antes de realizar el proceso de fermentación.

Se recomienda medir las concentraciones de bioetanol por el método de cromatográfico.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Abril, M. (2016). *Optimización de la reacción de hidrólisis ácida de los residuos de la planta de banano, para mayor rendimiento a glucosa* (Tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., & Raff, M. (2011). *Introducción a la biología Celular/ Essential cell biology* (3ª ed). Buenos Aires, Argentina: Médica panamericana.
- Alvarez, E., Pantoja, A., Ceballos, G., & Gañan , L. (2013). *Producción de lixiviado de raquis de plátano en el Eje Cafetero de Colombia*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Atkins, P., & Jones , L. (2012). *Principios de química: Los caminos del descubrimiento* (5ª ed). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Ayala, L., Martinez, M., Castro, M., García, A., & Delgado, E. (2016). Composición química del raquis de racimo de plátano (*Musa paradisiaca*) y aceptabilidad como alimento para cerdos en ceba. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 23(2), 1 – 8.
- Bandaru, V., Bandaru, S., Somalanka, S., Bejawada, S., Medicherla, N., & Devarajan, T. (2007). Optimization of fermentation parameters to enhance the production of ethanol from palmyra jaggery using *Saccharomyces cerevisiae* in a batch fermentor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 143(3), 224 – 235.
- Barroso Casillas, M. (2010). *Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería* (tesis de pregrado). Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España.
- Bastidas, B. D. (2013). *Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) de raquis de palma africana (Elaeis guineensis) pre tratado con ácido y álcali para la producción de etanol de segunda generación* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Católica Del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Boudarel , M. (1984). *Contribución al estudio de la fermentación alcohólica del jugo de remolacha con Saccharomyces cerevisiae* (Tesis doctoral). Universidad de Borgoña, Dijon, Francia.

- Brennan, A., Hougl, W., & Schell, D. (1986). High temperature acid hydrolysis of biomass using an engineering scale plug flow reactor: results of low solids testing. *Biotechnol Bioeng*, 100, 53-70.
- Buenrostro, O., Bernache, G., & Bocco, G. (2001). Urban solid waste generation and disposal in México. *Waste Management & Research*, 19, 169 – 176.
- Castillo Rodriguez, F. (2005). *Biotecnología ambiental*. Madrid, España: TEBAR.
- Cedillo Ochoa, E. (2010). *Estudio comparativo entre muestras de sangre y orina para determinación de la concentración de alcohol* (Tesis doctoral). Instituto Politécnico Nacional, México, México.
- Cevallos Chamorro, Z., & Chariguaman Chilibingua, E. (2016). *Efecto de la temperatura y concentración de H₂SO₄ y H₃PO₄ en la producción de azúcares en el pretratamiento de rastrojos de maíz (Zea mays)* (Tesis de pregrado). Universidad Zamorano, Honduras.
- Cortínez, V. (2010). *Comparación de pretratamiento en residuos forestales para la producción de bioetanol se segunda generación: hidrólisis ácida y líquidos iónicos* (Tesis de Maestría). Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile.
- Cuadrado, B., & Vélez, M. (2006). Práctica N^o 1. *Obtención de vino de frutas. Guía de Prácticas de Microbiología Industrial*. Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.
- Cunningham, R., & López, G. (1994). *Etanol de Lignocelulósicos: Tecnología y Perspectivas*. Santa Fe, Argentina: Universidad de Santiago de Compostela.
- Curtis, H., Barnes, N., Massarini, A., & Schnerck, A. (2008). *Biología* (7^a ed). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana .
- Eggeman, T., & Elander, R. T. (2005). Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, 96(18), 2019 – 2025.
- Escalante, J., & Fuentes, H. (2013). *Estudio Experimental de la Obtención de Bioetanol a Partir de Residuos Agrícolas de banano orgánico en Piura* (Tesis de pregrado). Universidad de Piura, Piura, Perú.

- Espinoza Cajas, F. (2013). *Obtención de etanol mediante hidrólisis alcalina, enzimática y fermentación a partir del excedente orgánico del banano variedad Musa Paradisiaca* (Tesis de pregrado). Universidad central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Fengel, D., & Wegener, G. (1984). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin, Alemania: Reprin.
- Fujita, Y., Ueda, M., Fukuda, H., & Kondo, A. (2004). Synergistic Saccharification, and Direct Fermentation to Ethanol, of Amorphous Cellulose by Use of an Engineered Yeast Strain Codisplaying Three Types of Cellulolytic Enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 1207 – 12012.
- Galbe , M., & Zacchi , G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology Biotechnology*, 59, 618 – 628.
- Galvis Jacome, M. (2009). *Estudio del proceso de fermentación de glucosa para la producción de bioetanol a partir de lecaduras nativas* (Tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- Griffin, R. (1981). *Química orgánica moderna*. Barcelona, España: Reverté.
- Grosch, W., & Schieberle, P. (1997). *Química de los alimentos* (3ª ed). Zaragoza, España: Acribia.
- Guarnizo, A., Martínez, P., & Pinzón, M. (2012). Azúcares del pseudotallo de plátano: una opción para la obtención de alcohol de segunda generación. *Bistua*, 10(1), 39 – 51.
- Hendrics, A., & Zeeman, G. (2008). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1), 10 – 18.
- Herrera, C., Bolaños, N., & Lutz, G. (2003). *Química de alimentos: Manual de laboratorio* (1ª ed). Costa Rica: Comisión Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Holum, J. R. (1990). *Principios de Fisicoquímica, Química Orgánica y Bioquímica*. México, México: Limusa Wiley.

- Hu, Z., & Wen, Z. (2008). Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. *Biochemical engineering journal*, 38, 369 – 378.
- Iranmahboob, J. (2011). Optimizing acid-hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips. *Biomass and Bioenergy*, 22, 401 – 404.
- Jian, X., Hongzhang, C., Zsófia, K., Thomsen , A., Schmidt , J., & Huadong, P. (2011). Optimization of microwave pretreatment on wheat straw for ethanol production. *Biomass and bioenergy*, 35, 3859 – 3864.
- Keller, F. (1996). *Integrated bioprocess development for bioethanol production*. Bristol, EE.UU: Taylor & Francis.
- Kumar, S., Gupta, L., & Gupta, R. (2010). Cellulose pretreatment in subcritical water: Effect of temperature on molecular structure and enzymatic reactivity. *Bioresource technology*, 101, 1337 – 1347.
- Larsson, S., Quintana- sáinz, A., Reimann, A., Nilvebrant, N., & Jonsson, L. (2000). Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 84 (1), 617 – 312.
- Medina Morales, M., Lara Fernández, L., Aguilar, C., & De la GarzaToledo, H. (2011). Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol como carburante. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 3(6), 1 – 7.
- Melo Espinoza, E., Sánchez Borroto, Y., & Ferrer Frontela, N. (2012). Evaluación de un motor de encendido por chispa trabajando con mezclas etanol-gasolina. *Ingeniería Energética*, 33(2), 94 – 102.
- Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31, 426.
- Ministerio de Agricultura y Riego. (2016). Boletín estadístico de producción Agrícola, pecuaria y avícola. Recuperado de <http://www.minagri.gob.pe>
- Mustafat, B. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway. *Energy conversion and Management*, 52, 858 – 875.

- Narvaes , N., & Martin , M. (2006). *Degradacion Enzimatica de la biomasa de Onopordum nervosum bois*. Madrid, España: Editorial Universidad Complutense.
- Narendra, N. D., Mood, M., Venkata, D., Vaibhav, V., Srinivasa, R., & Tamal, B. (2017). Dilute acid pretreatment of sorghum biomass to maximize the hemicellulose hydrolysis with minimized of fermentative inhibitors for bioethanol production. *Biotechnology*, 7(139), 1-12.
- Nigam, J. N. (2001). Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of Biotechnology*, 87, 17-27.
- Nuñez, C. (2008). Análisis Químico de la madera. Disponible en: <http://www.cenunez.com.ar>.
- Okamoto, T., Taguchi, H., Nakamura, K., Ikenaga, H., & Kur, H. (1993). *Zymobacter palmae* gen. nov., sp. nov., a new ethanol-fermenting Peritrichous bacterium isolated from palm sap. *Archives Microbiology*, 21, 333 – 337.
- Oliva Dominguez, J. (2003). *Efectos de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre Kluyveromyces marxianus* (Tesis doctoral). Universidad Complutense De Madrid, Madrid, España.
- Olsson, L., & Hahn-Hägerdal, B. (1996). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 312 – 331.
- Orea Igarza, U., Cordero, E., & Gómez, R. (2006). *Estudio comparativo de la composición química de la corteza de tres especies de eucaliptos a tres alturas del fuste comercial* (Tesis de Maestría). Universidad del Pinar del Río, Pinar del Río, Cuba.
- Palmowski , L., & Müller , J. (200). Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. *National Center for Biotechnology Information*, 41(3), 155 – 62.
- Pezoa Conte, R. (2010). *Estudio de pretratamiento con ácido diluido y líquidos iónicos en residuos agrícolas para la producción de bioetanol de segunda generación* (Tesis de Maestría). Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile.

- Quihue Cabezas, J. (2014). *Obtencion de fibras a partir de raquis de plátano para la producción de pulpa de papel* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga, Ayacucho, Perú.
- Ramírez, C., Tapia, A., y Calvo, P. (2010). Evaluación de la calidad de fruta de banano de altura que se produce en el cantón de Turrialba de Costa Rica. *InterSedes*, 6(20), 107 – 127.
- Rodríguez, N., & Zambrano, A. (2011). Producción de alcohol a partir del mucílado de café. *Cenicafé*, 62(1), 56 – 69.
- Sánchez, D., & Valarezo, L. (2014). *Obtención de aceite lubricante a partir de residuos de banano* (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Sanchez, O., & Cardona, C. (2005). Producción biotecnología de alcohol carburante: obtención a partir de diferentes materias primas. *INCI*, 11(30) 234 – 340.
- Santa María, M., Ruíz, A., Cruz, A., Jeoh, T. (2013). Assessing the feasibility of biofuel production from lignocellulosic banana waste in rural agricultural communities in Peru and Colombia. *Bioenergy Research*, 6 (3), 1000 – 1011. doi: 10.1007/s12155-013-9333-4
- Sarrouh, F., Jover, J., & González, E. (2005). Estudio de la hidrólisis del bagazo con ácido sulfúrico concentrado utilizando dos variantes de una sola etapa y una sola etapa modificada para la obtención de etanol. *Ingeniería e Investigación*, 25(3), 34 – 38.
- Shedden Harris, M. (1978). *Estudio del Raquis del banano (Musa cavendishii Lambert) e investigación de sus posibles usos*. Costa Rica: Centro de Documentación e Información (CEDI).
- Shleser, R. (1994). Ethanol Production in Hawaii: Processes, Feedstocks, and Current Economic Feasibility of Fuel Grade Ethanol Production in Hawaii. Hawaii State Department of Business, Economic Development & Tourism. Recuperado de https://energy.hawaii.gov/wpcontent/uploads/2011/10/ScenarioAcceleratedUseRenewableResourcesTransFuelsHawaii_2007.pdf

- Skotnicki, M., Warr, R., Goodman, A., & Lee, K. (1982). High-productivity alcohol fermentations using *Zymomonas mobilis*. *Biochemical Society Symposia*, 19, 53 – 86.
- Skoog, D., West, D., & Holler, F. (2003). *Fundamentos de Química Analítica* (4ª ed). Barcelona, España: Reverté.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1 – 11.
- Taherzadeh, M., Gustafsson, L., Niklasson, C., & Linden, G. (1999). Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87, 169 – 174.
- Thomsen, M., Thomsen, A., & Xu, J. (2009). Enzymatic hydrolysis and fermentability of corn stover pretreated by lactic acid and/or acetic acid. *Journal of Biotechnology*, 139(4), 300 – 305.
- Turrado, J., Saucedo, A., Sanjuán, R., y Sulbaran, B. (2009). Pinzote de *Musa balbisiana* y *Musa acuminata* como Fuente de Fibras para Papel. *Scielo*, 20(4), 117 – 122.
- 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.
- Winekb, T., Winek, C., & Wahba, W. (1996). The effect of storage at various temperatures on blood alcohol concentration. *Forensic Science International*, 78(3), 179 – 185.
- Wyman, C. (1996). *Ethanol production from lignocellulosic biomass*. Bristol, EE.UU: Taylor & Francis.
- Yang, B., & Wyman, C. E. (2008). Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2(1), 26 – 40.
- Zaafouri, K., Ziadi, M., Hassen-Trabelsi, A., Mekni, S., Aiissi, B., Alaya, M., Hamdi, M. (2017). Optimization of Hydrothermal and Diluted Acid Pretreatments of Tunisian *Luffa cylindrica* (L.) Fibers for 2G Bioethanol Production through the Cubic Central Composite Experimental Design CCD: Response Surface Methodology. *BioMed*, 2(1), 32 – 38.

- Zhao, X., Zhang, L., & Liu, D. (2008). Comparative study on chemical pretreatment methods for improving enzymatic digestibility of crofton weed stem. *Bioresource Technology*, 99(9), 3729 – 3736.
- Zor, T., & Selings, Z. (1996). Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its. *Analytical Biochemistry*, 236(2), 302 – 308.

VII. ANEXO

ANEXO 1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICO DE LA MATERIA PRIMA

1. DETERMINACION DE HUMEDAD Y MATERIA SECA (AOAC, 1990) / 964.22.

Crisoles o cápsulas de porcelana: se desecó a 100°C x 2h, se tomó con pinzas de crisol y se registró el peso vacío. Para la determinación de la humedad se pesó aproximadamente 5 g de muestra en una balanza de precisión dentro de una cápsula previamente tarada, desecándose a 110 °C en estufa, hasta alcanzar un peso constante.

La pérdida de peso se consideró como el contenido de humedad y el residuo desecado del alimento se consideró la materia seca. Los resultados obtenidos se expresaron porcentualmente.

El contenido de humedad se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%H = \frac{m_1 - m_2}{m_1}$$

$\%H$ = Contenido de humedad en porcentaje de masa

m_1 = masa inicial de la muestra, antes del calentamiento en g

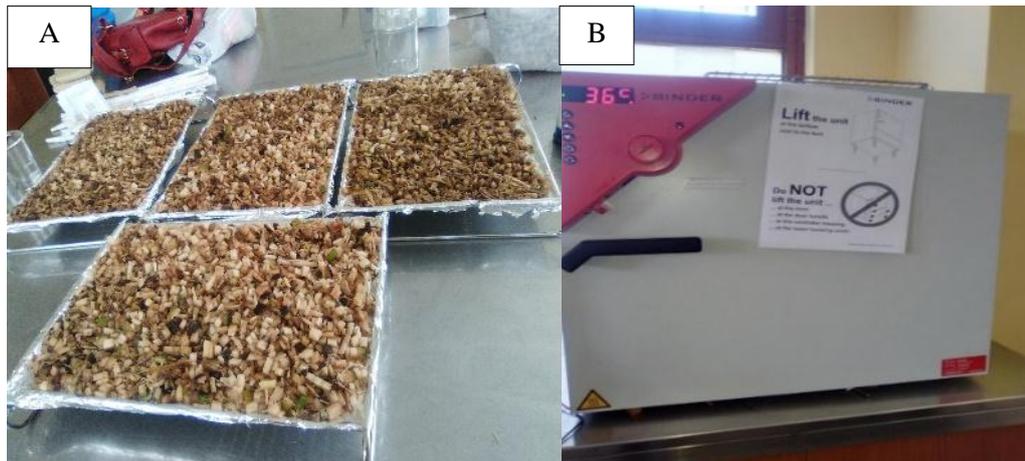
m_2 = masa final de la muestra, después del calentamiento en g

$$\%H = \frac{1075 \text{ g} - 1004.2 \text{ g}}{1075 \text{ g}} * 100\% = 6.58\%$$

El contenido de materia seca se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%Ms = 100\% - \%H$$

$$\%MS = 100\% - 6.58 = 93.42\%$$



2. DETERMINACION DE PORCENTAJE DE CELULOSA POR EL MÉTODO DE KÛRSHNER – HÖFFER (Orea *et al.*, 2006)

El contenido porcentual de celulosa se determinó mediante el método de KÛrshner - Höffer, los materiales libres de sustancias extraíbles se le añadieron 25 mL de mezcla reactiva de HNO₃ – bioetanol (1:4); se colocaron a reflujo en baño de agua durante una hora, se decantaron y se añadieron una nueva cantidad de mezcla reactiva, repitiendo esta operación tres veces. Posteriormente se añadieron 25 mL de KOH al 1% durante 30 minutos, se filtró y los sólidos se secaron.

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{A}{W} * 100$$

Donde:

$A = \text{Peso del residuo seco (g)}$

$W = \text{Peso seco de la muestra (g)}$

$A = 16.3 \text{ g}$

$W = 50 \text{ g}$

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{A}{W} * 100 = 32.60\%$$

3. DETERMINACION DE PORCENTAJE DE LIGNINA POR EL MÉTODO DE KLASON (Núñez, 2008)

El contenido de lignina insoluble en ácido se realizó en las muestras libres de sustancias extraíbles. Las muestras se mezclaron con 15 mL de H₂SO₄ al 72%, se agitó con frecuencia a 15 °C durante 2 horas. Las mezclas se diluyeron con agua destilada, se colocaron a reflujo durante 4 horas, se filtraron, y los residuos se secaron hasta masa constante, según el método de Klason descrita por Núñez (2008)

$$\% \text{ Lignina} = \frac{PM_f}{PM_0} * 100$$

PM_0 = *Peso de la muestra antes de la hidrólisis acida y secado*

PM_f = *Peso de la muestra después de la hidrólisis acida y secado*

$$\% \text{ Lignina} = \frac{95}{9.35} * 100 = 9.85 \%$$

$$PM_0 = 95 \text{ g}$$

$$PM_f = 9.35 \text{ g}$$

4. DETERMINACIÓN DE PORCENTAJE DE CENIZAS POR EL MÉTODO: MUFLA (AOAC, 1990)

Se pre-pesó un crisol con 5 ml de HNO₃ y 5 g de raquis de banano (P₁), se calentó el material hasta formar carbón, la muestra se colocó en un horno de mufla durante 6 horas a 555 °C y luego se pesó (P₂), y realizó la siguiente formula:

$$\% \text{ ceniza} = \frac{P_1 - P_2}{\text{peso de la muestra}} * 100$$

$$P_1 = 35.25 \text{ g}$$

$$P_2 = 34.68 \text{ g}$$

$$\text{Peso muestra} = 5 \text{ g}$$

$$\% \text{ ceniza} = \frac{35.25 \text{ g} - 34.68 \text{ g}}{5 \text{ g}} * 100 = 11.4\%$$

ANEXO 2. CURVA PATRÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO DE DNS 3,5-ÁCIDO DINITROSALISILICO (DNS) (Miller, 1959)

1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Se preparó una solución de NaOH (2 gramos de NaOH y se disolvió en 125 mL de agua destilada) y se adicionó 1.25 g de DNS + 37.5 g de tartrato de sodio y potasio, se disolvió delicadamente hasta completa disolución.

En un balón aforado de 250 mL, se vertió lentamente y con agua destilada se aforó hasta la marca. Se mezcló bien y se envasó el reactivo en un frasco oscuro ámbar. Se dejó almacenado en la oscuridad

2. PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES

En un matraz se preparó 50 ml de un patrón de glucosa 2 g/L. Se realizó diferentes concentraciones para la curva patrón como lo muestra en la tabla. Se tapó los tubos con tapa rosca. Y se llevó a calentamiento a 100 °C durante 10 min y luego a baño de hielo por 5 min.

Transcurrido el tiempo se agregó 5 mL de agua destilada a cada tubo y se dejó en reposo 15 min. Finalmente se leyó a 540 nm como longitud de onda y se calculó la concentración de azúcares reductores que hay en los tubos.

	Blanco	1	2	3	4	5	6	7	8
Volumen de solución 1(mL)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.7	0.9	1
Volumen de agua (mL)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.3	0.1	0
Volumen DNS (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES (g/L)

Se calculó la concentración de los tubos, teniendo en cuenta que parte de 50 ml a 2 g/L de glucosa, además se debe tener en cuenta que los tubos del 1 al 8 se diluyen con 5 ml con agua destilada. Una vez determinada las concentraciones de cada tubo, se graficó en Excel usando el gráfico de dispersión (y la ecuación de la recta), la ecuación generada se usó para determinar la concentración de azúcares reductores en las muestras problema, así:

$$Y = ax+b$$

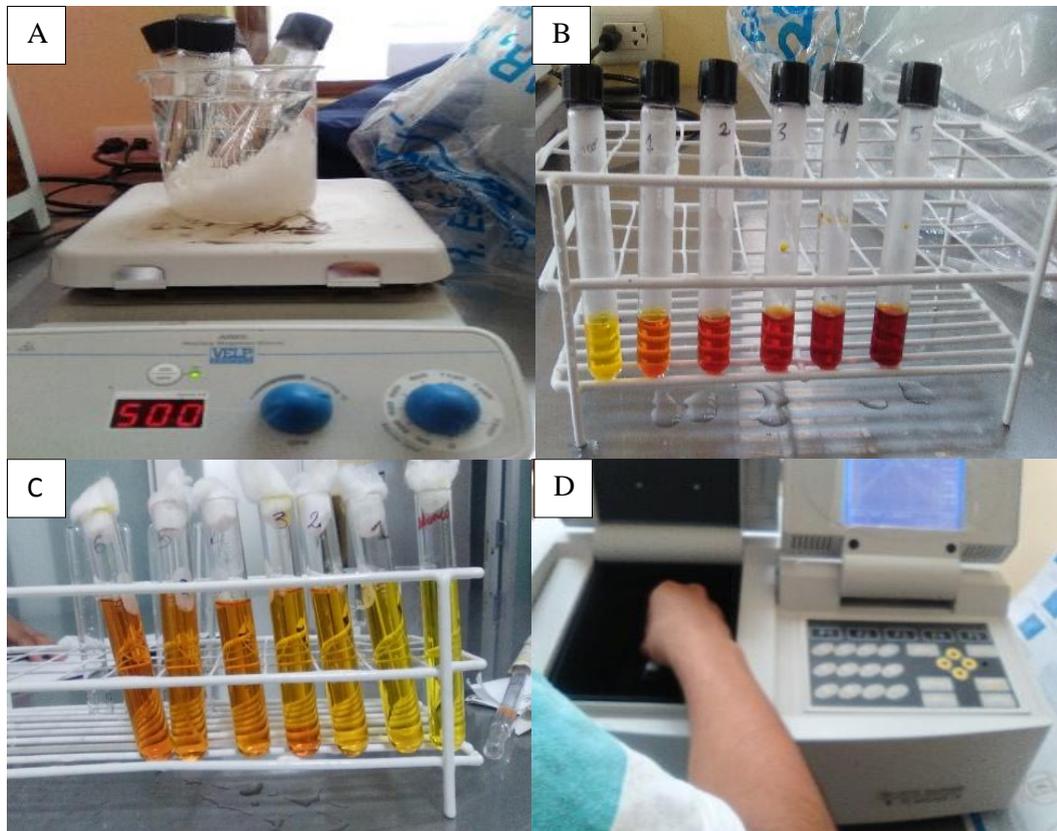
Dónde:

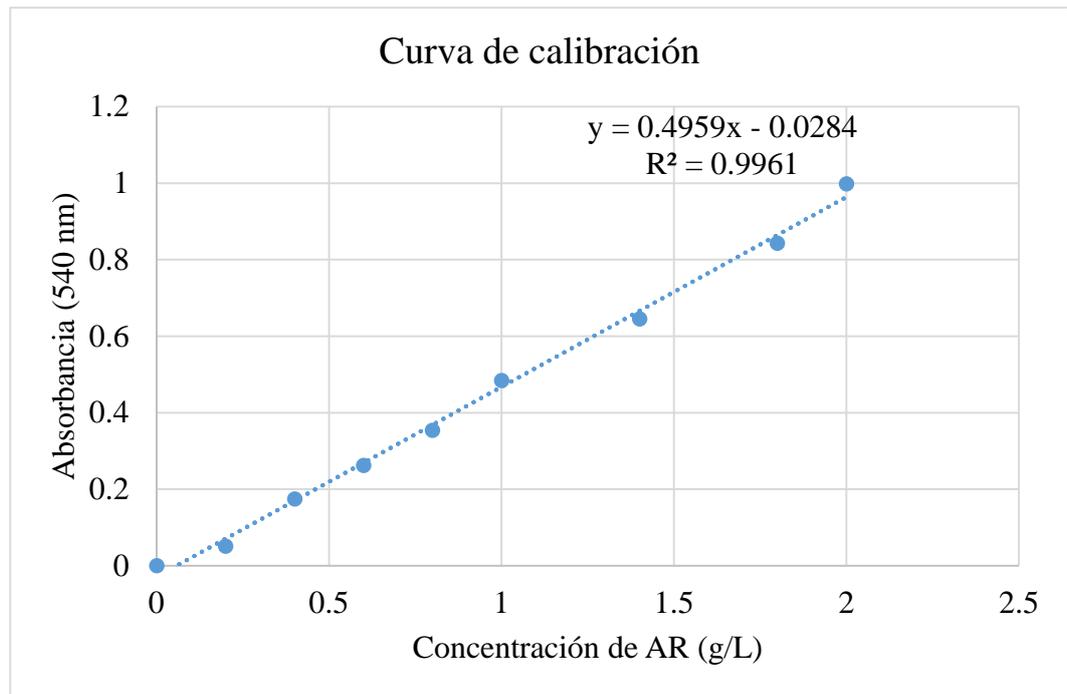
Y = las absorbancias de la muestra problema.

A = pendiente de la recta, se obtiene de la recta

B = es el corte en el eje y, se obtiene de la recta

X = es la concentración de azúcares reductores de la muestra expresada en g/L.





Tratamientos	Temperatura (°C)	Ácido sulfúrico (% v/v)	Después del pretratamiento		En la fermentación	
			Absorbancia (540 nm)	AR (g/L)	Absorbancia (540 nm)	AR (g/L)
1	100.00	3.00	0.50	10.07	0.57	11.63
2	100.00	7.00	0.63	12.68	0.70	14.24
3	140.00	3.00	0.56	11.42	0.64	12.98
4	140.00	7.00	0.59	11.98	0.67	13.54
5	91.72	5.00	0.49	10.00	0.57	11.56
6	148.28	5.00	0.53	10.83	0.61	12.39
7	120.00	2.17	0.42	8.60	0.50	10.16
8	120.00	7.83	0.75	15.13	0.82	16.69
9	120.00	5.00	0.84	17.02	0.93	18.88
10	120.00	5.00	0.84	17.03	0.93	18.89
11	120.00	5.00	0.84	17.04	0.93	18.90

ANEXO 3. CURVA PATRÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA POR KIT GLICEMIA ENZIMÁTICA AA (WEIMAR LAB.)

1. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (g/L)

Se determinó la concentración de glucosa en las muestras hidrolizadas utilizando el kit Glicemia enzimática AA (Weimar lab.). En un matraz se preparó 50 ml de un patrón de glucosa 5 g/L. Se realizó diferentes concentraciones para la curva patrón como se muestra en la tabla. Se tomaron muestras de 2ml en tubos eppendorf y se centrifugaron durante 5 minutos a 15 000 rpm. Luego se adicionó 5 µl de cada muestra centrifugada y 0.5 ml de solución enzimática en tubos eppendorf llevándolo a agitación.

Después se incubó las muestras durante 5 minutos en baño maría a 37°C, transcurrido el tiempo se procedió a leer en espectrofotómetro a 505 nm como longitud de onda y se calculó la concentración de glucosa presente en los tubos.

Dilución	Blanco	1	2	3
Volumen de solución (mL)	0	0.3	0.7	1
Volumen de agua (mL)	1	0.7	0.3	0
Solución enzimática (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5

2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (g/L)

Se calculó la concentración de glucosa en las muestras, teniendo en cuenta que parte de una solución de 50 ml a 5 g/L de glucosa. Una vez determinada las concentraciones, se graficó la curva de calibración en Excel usando el gráfico de dispersión (y la ecuación de la recta), dicha ecuación se usó para determinar la concentración de azúcares reductores en las muestras problema, así:

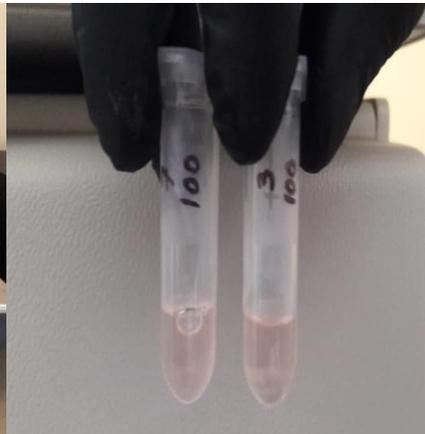
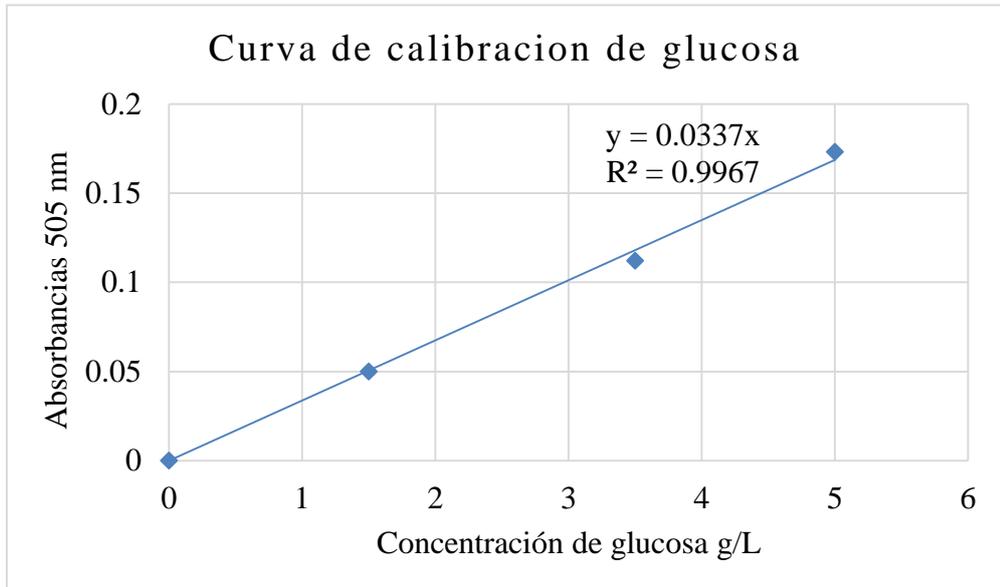
$$Y = ax$$

Dónde:

Y = las absorbancias de la muestra problema.

A = pendiente de la recta, se obtiene de la recta

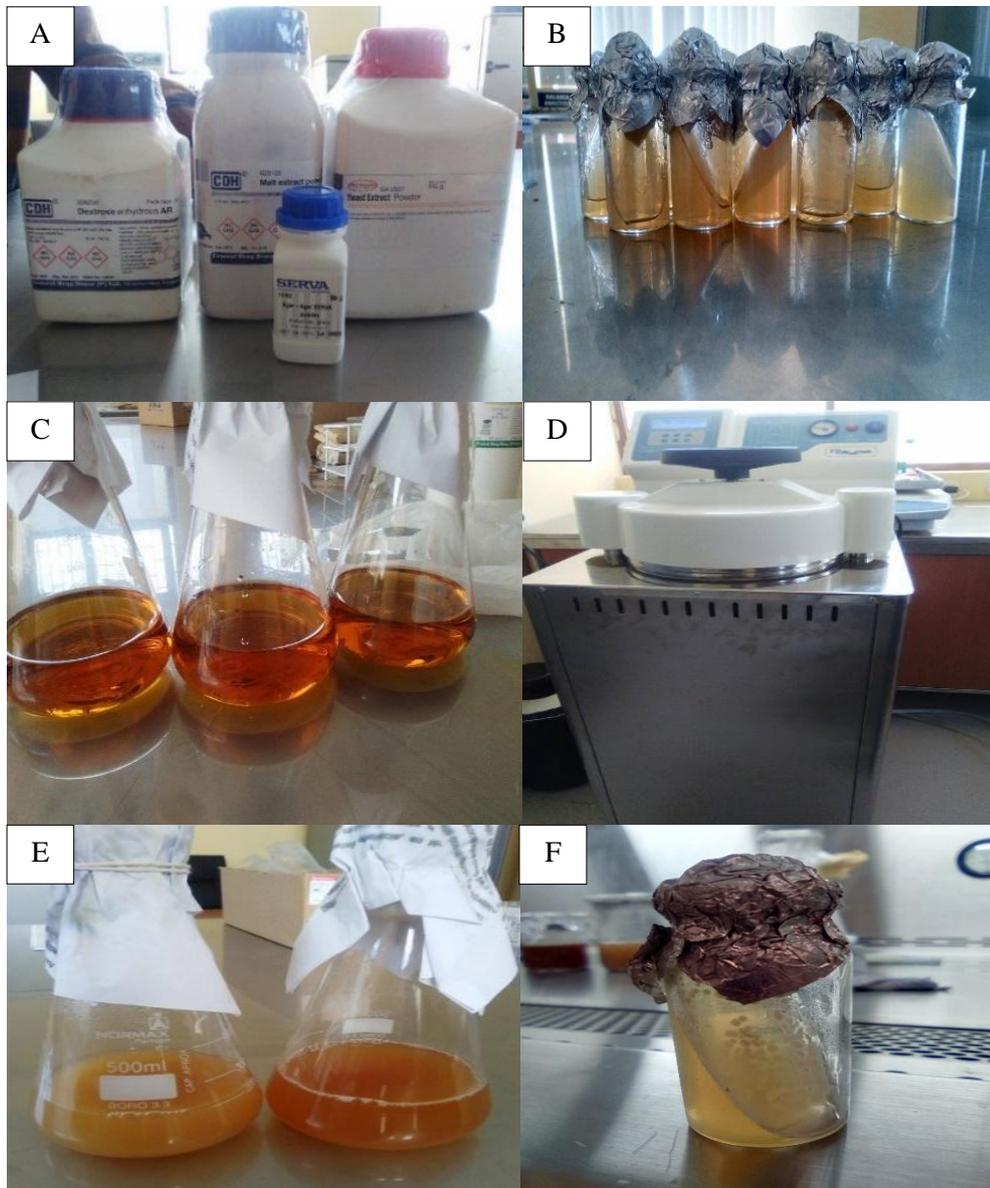
X = es la concentración de glucosa en las muestras expresada en g/L.



Tratamientos	Temperatura (°C)	Ácido sulfúrico (% v/v)	Después del pretratamiento		En la fermentación	
			Abs (540 nm)	Glucosa (g/L)	Abs (540 nm)	Glucosa (g/L)
1	100.00	3.00	0.05	4.65	0.07	5.95
2	100.00	7.00	0.11	9.35	0.12	10.65
3	140.00	3.00	0.08	6.76	0.09	8.06
4	140.00	7.00	0.07	6.48	0.09	7.98
5	91.72	5.00	0.09	8.41	0.11	9.76
6	148.28	5.00	0.08	6.98	0.10	8.68
7	120.00	2.17	0.06	5.59	0.08	7.29
8	120.00	7.83	0.13	11.79	0.17	14.78
9	120.00	5.00	0.15	13.49	0.17	15.47
10	120.00	5.00	0.15	13.51	0.17	15.49
11	120.00	5.00	0.15	13.54	0.17	15.52

ANEXO 4. PREPARACIÓN DEL INOCULO DE LEVADURA

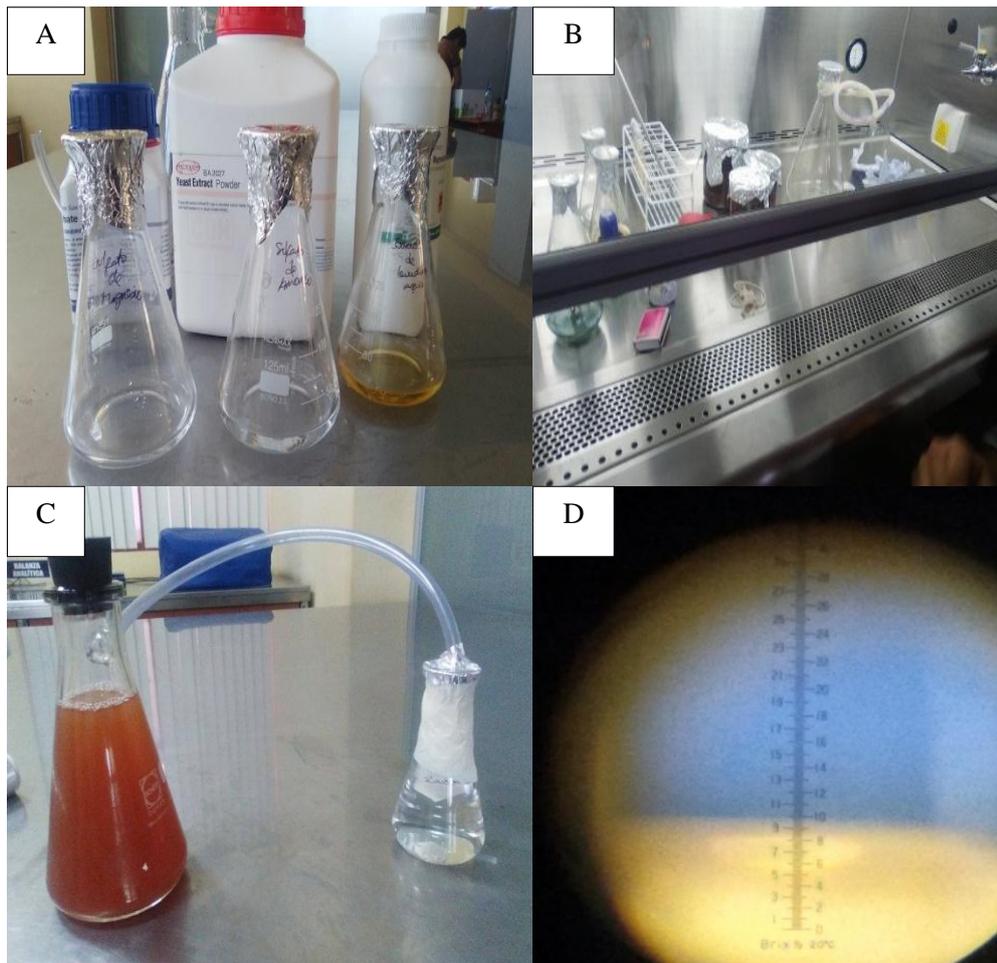
El inóculo de levadura se cultivó asépticamente en un matraz Erlenmeyer que contenía 250 mL de medio de levadura (YM) (1.2 g/L de extracto de levadura, 6 g/L de extracto de malta, 6 g/L de dextrosa). La temperatura fue 30°C y velocidad de agitación de 150 rpm, durante 72 horas. Luego de 3 días se observó el crecimiento del microorganismo en el matraz. Posteriormente, se preservó la levadura *S. cerevisiae* ATCC 4126 en viales contenidas medios solidos YM adicionando 5 g/L de agar, y se dejó incubar por tres días en una incubadora a 28°C, finalizado el tiempo se llevó a refrigeración 4°C hasta su posterior utilización.



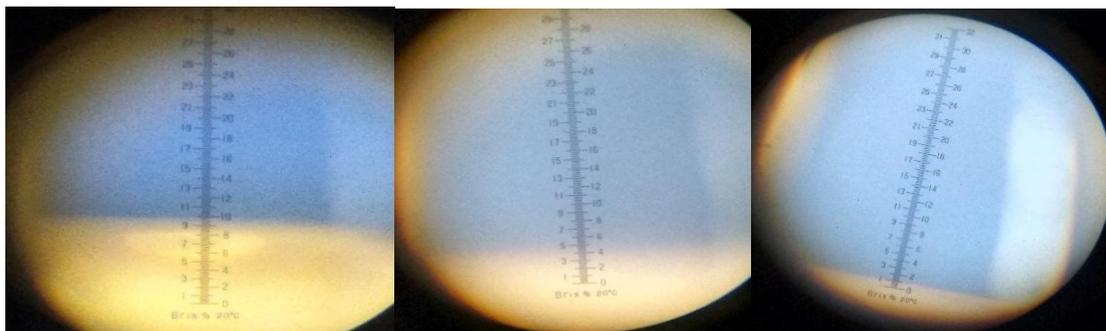
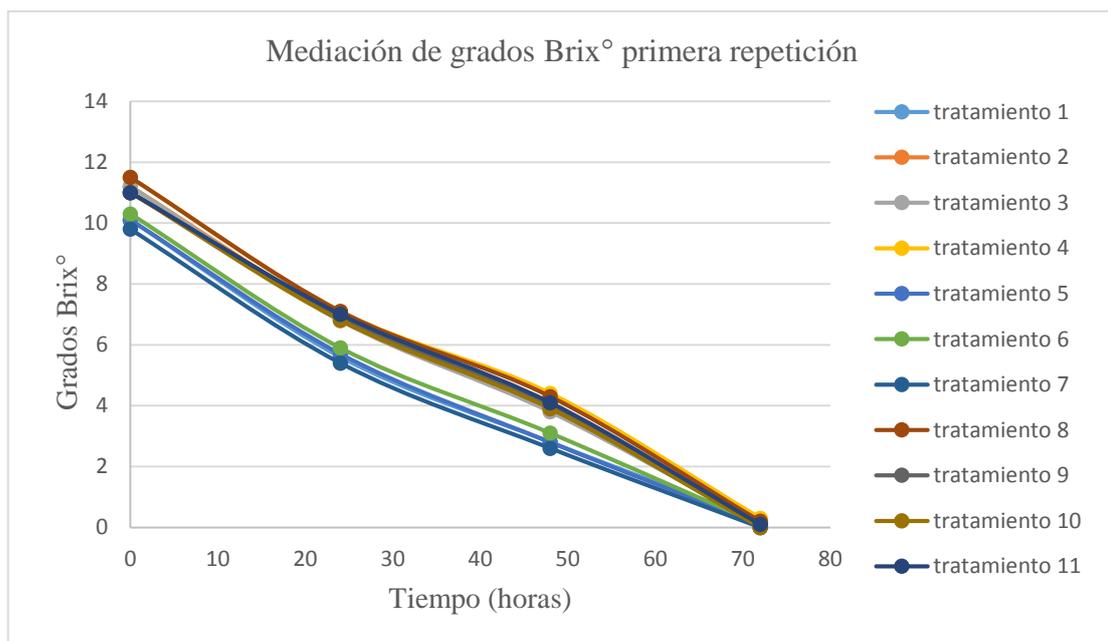
ANEXO 5. FERMENTACION DE LA MUESTRA HIDROLIZADA

Se tomó una muestra de 25 mL de la mezcla hidrolizada (sólo parte líquida), la cual se sometió a vapor en una autoclave a 121 °C por 2 horas, con el objetivo de elevar la concentración de azúcares necesaria para la activación de la levadura para el proceso de fermentación. Después de la hidrólisis, se ajustó el pH a 4,5 – 5,0 con NaOH 10 N.

Como nutrientes se utilizó sulfato de amonio, extracto de levadura, sulfato de magnesio, y como fuente de carbono se utilizó la muestra hidrolizada. La fermentación se realizó en matraces kitasatos de 500 mL, con un volumen efectivo de trabajo de aproximadamente 100 mL en anaerobiosis a 28°C, se controló el pH y la temperatura de la fermentación alcohólica, por un tiempo de 72 horas. Se midió diariamente el grado Brix hasta dar por concluido el proceso, tiempo en el que el grado Brix disminuye hasta alcanzar un valor constante.



Tratamientos	Temperatura °C	Ácido sulfúrico (%v/v)	Grados Brix tomadas en horas			
			0	24	48	72
1	100.00	3.00	10.1	6.0	3.1	0.0
2	100.00	7.00	11.3	7.3	4.2	0.3
3	140.00	3.00	11.2	7.2	4.1	0.2
4	140.00	7.00	11.6	7.5	4.6	0.5
5	91.72	5.00	10.2	6.1	3.1	0.1
6	148.28	5.00	10.3	6.3	3.3	0.3
7	120.00	2.17	9.9	5.8	2.8	0.0
8	120.00	7.83	11.4	7.5	4.5	0.5
9	120.00	5.00	11.3	7.3	4.3	0.3
10	120.00	5.00	11.3	7.3	4.3	0.3
11	120.00	5.00	11.3	7.3	4.3	0.3

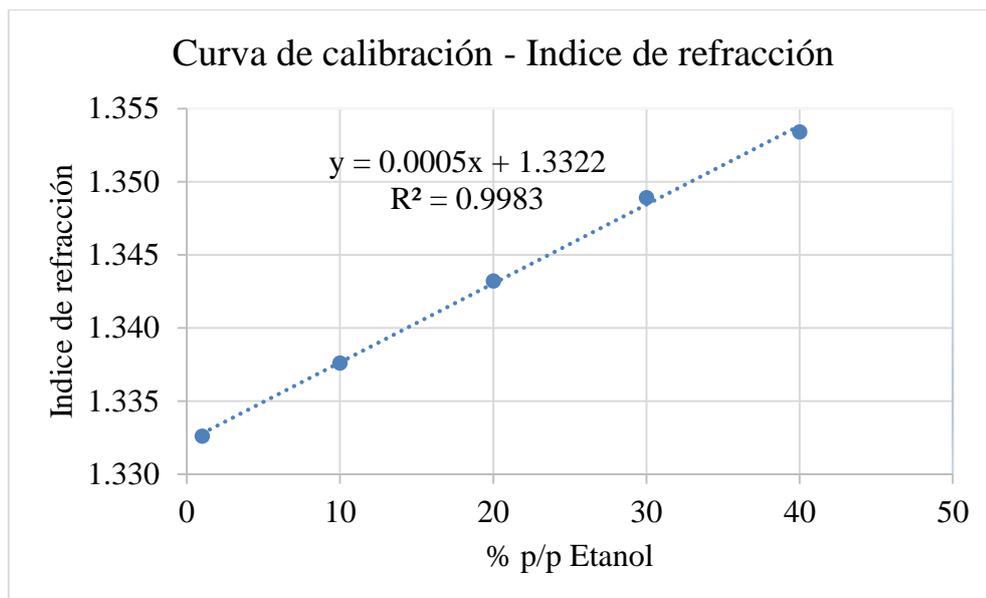


ANEXO 6. CURVA PATRÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOETANOL POR EL MÉTODO DE REFRACTOMETRÍA

1. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CONCENTRACIÓN DE BIOETANOL (g/L)

Para la curva de calibración se preparó diferentes concentraciones a partir de etanol al 96 % p/p a un volumen de 25 mL y luego a cada una de las concentraciones se midió el índice de refracción utilizando un refractómetro RFM300-M, las medidas fueron tomadas a una temperatura de 26 °C como se muestra en la tabla.

N°	% p/p	Etanol (mL)	Agua destilada (mL)	Índice de refracción
1	1	0.26	99.74	1.333
2	10	2.60	97.40	1.338
3	20	5.20	94.80	1.343
4	30	7.81	92.19	1.349
5	40	10.41	89.59	1.353
6	50	13.00	87.00	1.357
7	60	15.62	84.38	1.359
8	70	18.20	81.80	1.361
9	80	20.83	79.17	1.362
10	90	23.40	76.60	1.361
Blanco	96	25.00	75.00	1.360



Tratamiento	Índice de refracción	%p/p	Bioetanol (g/L)
1	1.332	0.19	1.50
2	1.333	0.74	5.80
3	1.332	0.46	3.60
4	1.332	0.16	1.30
5	1.333	0.66	5.20
6	1.332	0.11	0.85
7	1.332	0.49	3.90
8	1.333	0.93	7.30
9	1.333	1.12	8.80
10	1.333	1.13	8.90
11	1.333	1.14	9.00

Tratamientos	Temperaturas (°C)	Concentraciones de ácido sulfúrico (% v/v)	Concentraciones de bioetanol (g/L)
1	100	3	1.50
2	100	7	5.80
3	140	3	3.60
4	140	7	1.30
5	91.71	5	5.20
6	148.28	5	0.85
7	120	2.17	3.90
8	120	7.82	7.30
9	120	5	8.80
10	120	5	8.90
11	120	5	9.00

ANEXO 7. DETERMINACIÓN DE RENDIMIENTO DE BIOETANOL

Se evaluó el rendimiento de producto a partir de la cantidad de sustrato, los datos tomados fueron las concentraciones de azúcares reductores (g/L) y concentraciones de bioetanol (g/L) por cada tratamiento.

Se calculó $Y_{p/s}$ mediante la siguiente fórmula:

$$Y_{p/s} = \frac{\text{Producto formado (bioetanol)}}{\text{Consumo de sustrato}}$$

Donde:

Bioetanol = Concentración final de etanol (g/L)

Sustrato = Concentración de azúcar reductor (g/L)

Tratamiento	Temperatura (°C)	Ácido sulfúrico (%v/v)	Bioetanol (g/L)	Glucosa (g/L)	AR (g/L)	$Y_{p/s}$
1	100.00	3.00	1.50	5.95	11.63	0.13
2	100.00	7.00	5.80	10.65	14.24	0.41
3	140.00	3.00	3.60	8.06	12.98	0.28
4	140.00	7.00	1.30	7.98	13.54	0.10
5	91.72	5.00	5.20	9.76	11.56	0.45
6	148.28	5.00	0.85	8.68	12.39	0.07
7	120.00	2.17	3.90	7.29	10.16	0.38
8	120.00	7.83	7.30	14.78	16.69	0.44
9	120.00	5.00	8.80	15.47	18.88	0.47
10	120.00	5.00	8.90	15.49	18.89	0.47
11	120.00	5.00	9.00	15.52	18.90	0.48

ANEXO 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

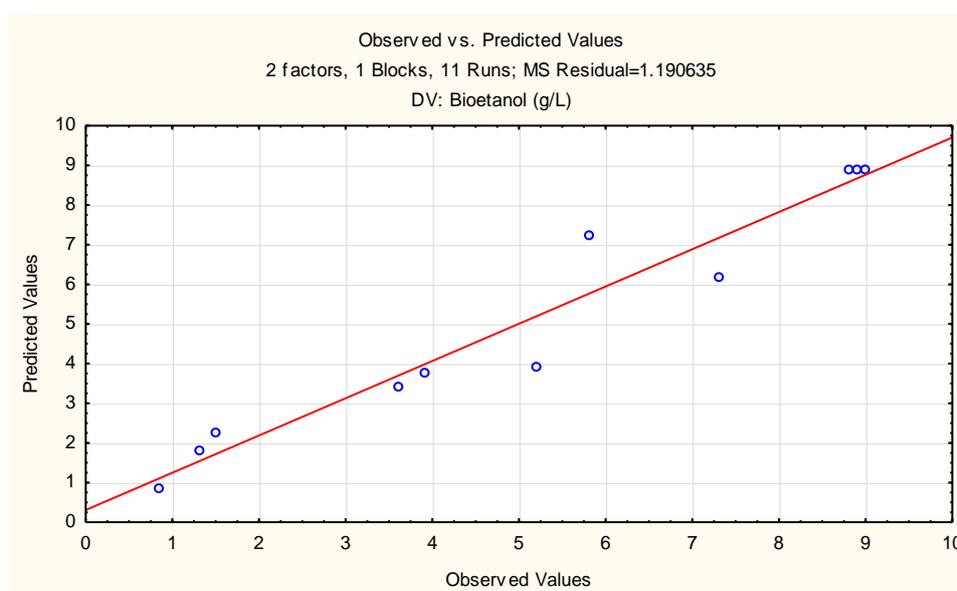
1. ANÁLISIS DE LOS MODELOS DE DCCR PARA LA CONCENTRACIÓN DE BIOETANOL

Determinación del mejor modelo que correlaciona los datos experimentales en la concentración de bioetanol (g/L).

Modelos de análisis del DCCR				
	1	2	3	4
R^2	0.15267	0.82784	0.26398	0.93915
Suma de cuadrados del Error	82.89639	16.84318	72.00639	5.95318

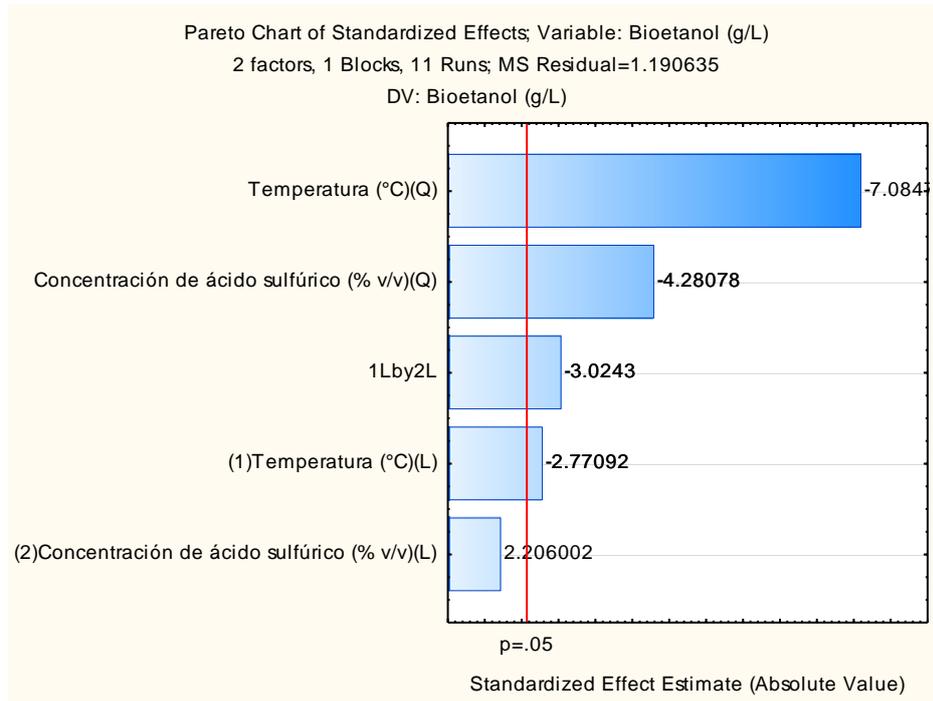
2. LINEALIDAD DE LOS VALORES OBSERVADOS VS. VALORES PREDICHOS DE LA CONCENTRACION DE BIOETANOL (g/L)

Evaluación de los valores observados en los diferentes pretratamientos de hidrólisis ácida comparados con los valores predichos según el diseño completo central rotacional (DCCR).



3. DIAGRAMA DE PARETO DE LAS VARIABLES CON EFECTOS ESTANDARIZADOS

Evaluación de los efectos significativos de la temperatura de reacción y concentración de ácido sulfúrico en el proceso de hidrólisis ácida del material lignocelulósico para la obtención de bioethanol g/L.



INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO SULFÚRICO EN LA HIDRÓLISIS ÁCIDA DE RAQUIS DEL BANANO, VARIEDAD *Musa cavendish*, PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL POR *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4

INFORME DE ORIGINALIDAD

15%

INDICE DE SIMILITUD

13%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

11%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx

Fuente de Internet

2%

2

pirhua.udep.edu.pe

Fuente de Internet

1%

3

minagri.gob.pe

Fuente de Internet

1%

4

www.bdigital.unal.edu.co

Fuente de Internet

1%

5

Submitted to Universidad Nacional del Santa

Trabajo del estudiante

1%

6

ruja.ujaen.es

Fuente de Internet

1%

7

link.springer.com

Fuente de Internet

1%

8	documents.mx Fuente de Internet	1%
9	Submitted to Universidad de Jaén Trabajo del estudiante	1%
10	repository.uamerica.edu.co Fuente de Internet	1%
11	dspace.ucuenca.edu.ec Fuente de Internet	1%
12	repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet	<1%
13	cdigital.uv.mx Fuente de Internet	<1%
14	revista.cnic.edu.cu Fuente de Internet	<1%
15	Submitted to Universidad Nacional de Colombia Trabajo del estudiante	<1%
16	core.ac.uk Fuente de Internet	<1%
17	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	<1%
18	bdigital.zamorano.edu Fuente de Internet	<1%

19	edoc.pub Fuente de Internet	<1%
20	Submitted to Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales (FLACSO) - Sede Ecuador Trabajo del estudiante	<1%
21	repositorio.uss.edu.pe Fuente de Internet	<1%
22	Submitted to Fundacion Universidad de America Trabajo del estudiante	<1%
23	Submitted to CONACYT Trabajo del estudiante	<1%
24	repositorio.upct.es Fuente de Internet	<1%

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

< 15 words

Excluir bibliografía

Activo