

**Efecto de la temperatura y concentración de
 H_2SO_4 y H_3PO_4 en la producción de azúcares
en el pretratamiento de rastrojos de maíz (*Zea
mays*)**

**Zaida Verenice Cevallos Chamorro
Elvia Alexandra Chariguaman Chiliquinga**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2016

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Efecto de la temperatura y concentración de H_2SO_4 y H_3PO_4 en la producción de azúcares en el pretratamiento de rastrojos de maíz (*Zea mays*)

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingenieras de Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por:

Zaida Verenice Cevallos Chamorro
Elvia Alexandra Chariguaman Chiliquinga

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2016

Efecto de la temperatura y concentración de H_2SO_4 y H_3PO_4 en la producción de azúcares en el pretratamiento de rastrojos de maíz (*Zea mays*)

**Zaida Verenice Cevallos Chamorro
Elvia Alexandra Chariguaman Chilingua**

Resumen: El estudio evaluó el efecto de las temperaturas (104, 109, 120, 131 y 136 °C) y concentraciones de ácido sulfúrico diluido (4.6, 5, 6, 7 y 7.4% v/v) en la producción de azúcares durante el pretratamiento de rastrojos de maíz, utilizando la Metodología Superficie de Respuesta, se caracterizó el hidrolizado y se identificaron efectos esperados sobre pH, ° Brix, porcentaje de glucosa, fructosa, galactosa y azúcares totales. Se usó un Diseño Compuesto Central Rotacional con cuatro niveles factoriales, cuatro axiales y tres puntos centrales. Se caracterizó el material en porcentaje de humedad, FAD, FND, LAD. Se determinó que el pH incrementó de 0.2 a 0.5 cuando se redujo la concentración de ácido y la temperatura no tuvo efecto. Los ° Brix aumentaron de 6 a 16 al incrementar la concentración o reducirse la temperatura. El porcentaje de glucosa aumentó de 0.5 a 2.5% al disminuir la concentración y aumentar la temperatura. El porcentaje de galactosa incrementó al aumentar la concentración y disminuir la temperatura, de 16 a 24%. La fructosa incrementó de 1 a 3% al aumentar la temperatura o disminuir la concentración. Los azúcares totales incrementaron de 18 a 28% al aumentar la concentración y temperatura. Se concluye que el modelo fue tendencioso para las variables dependientes; sin embargo, la función de utilidad sugiere que aplicando a 130 °C y 4.58% v/v de H_2SO_4 se lograrán resultados deseados del hidrolizado.

Palabras clave: Ácido diluido, grados brix, lignocelulosa, pH.

Abstract: The study evaluated the effect of temperatures (104, 109, 120, 131 and 136 °C) and diluted Sulphuric acid concentrations (4.6, 5.6.7 and 7.4% v/v) into the sugars production, during the corn stover pretreatment, using the Response Surface Methodology, the hydrolysate was characterized and identifying the expected effects in pH values, ° Brix, glucose, fructose and percentage of total sugars. A Design Rotational Center Composition was used and described by independent variables with four factorial levels, four axial levels and three central points. The material was characterized as moisture percentage, ADF, NDF, ADL. It was determined that the pH increased 0.2 to 0.5 while reduced the acid concentration and the temperature has no effect. The Brix increased 6 to 16 when the acid concentration increased or when the temperature is reduced. The percentage of glucose increased 0.5 to 2.5% when the acid concentration decreased and temperature increased. The percentage of galactose increased when the acid concentration increased and temperature decreased in ranges of 16 to 24%. Fructose increased 1 to 3% when the temperature increased or decreased the acid concentration. The total sugar increased 18 to 28% when concentration and temperature increased. It is concluded that this model has a tendentious for all dependent variables; however, according to utility function it suggest that applying 130 °C and 4.58% v/v of H_2SO_4 , it will achieve desired results of hydrolysate quality.

Key words: Brix levels, diluted acid, lignocellulose, pH.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4. CONCLUSIONES.....	33
5. RECOMENDACIONES.....	34
6. LITERATURA CITADA	35
7. ANEXOS	40

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Pretratamiento de hidrólisis ácida basada en revisión de literatura	8
2. Niveles codificados de las variables independientes del experimento	9
3. Composición del diseño experimental, valores codificados y reales para cada tratamiento.....	10
4. Determinación de tamaño de partícula de Rastrojo Entero molido y pulverizado	11
5. Determinación de tamaño de partícula de Rstrojo Picado molido y pulverizado	14
6. Humedad de rastrojo de maíz	14
7. Composición química de Rastrojo de maíz	15
8. Análisis de varianza de la absorbancia para cada tratamiento.....	16
9. Análisis de varianza de pH para cada tratamiento.....	16
10. Análisis de varianza de ° Brix para cada tratamiento	17
11. Coeficientes de regresión, probabilidad, valores F y R ² para pH, en función de la.temperatura y concentración de H ₂ SO ₄ , durante el pretratamiento del material lignocelulósico.....	18
12. Coeficientes de regresión, probabilidad, valores F y R ² para ° Brix, en función de la temperatura y concentración de H ₂ SO ₄ , durante el pretratamiento del material lignocelulósico.....	19
13. Coeficientes de regresión, probabilidad, valores F y R ² para glucosa, en función de la.temperatura y concentración de H ₂ SO ₄ , durante el pretratamiento del material lignocelulósico.....	21
14. Coeficientes de regresión, probabilidad, valores F y R ² para galactosa, en función de la.temperatura y concentración de H ₂ SO ₄ , durante el pretratamiento del material lignocelulósico.....	23
15. Coeficientes de regresión, probabilidad, valores F y R ² para fructosa, en función de la.temperatura y concentración de H ₂ SO ₄ , durante el pretratamiento del material lignocelulósico.....	25
16. Coeficientes de regresión, probabilidad, valores F y R ² para azúcares totales, en función de la.temperatura y concentración de H ₂ SO ₄ , durante el pretratamiento del material lignocelulósico	27
17. Coeficientes de regresión, probabilidad, valores F y R ² para porcentaje de azúcares totales, en función de la temperatura y concentración de H ₂ SO ₄ , durante el pretratamiento de material lignocelulósico	29
18. Composición química del hidrolizado obtenido en condiciones óptimas .	32

1. INTRODUCCIÓN

El interés por la producción de etanol a partir de residuos agroindustriales ha ido creciendo a través del tiempo, ya que los combustibles fósiles son una fuente de energía no renovable y a largo plazo no será posible cubrir con la demanda mundial, además el impacto ambiental que generan dichos combustibles promueve la adopción de nuevas medidas para generar energía renovable; se considera que el avance tecnológico más importante a mediano plazo es la producción de bioetanol a partir de celulosa, esto implica una oportunidad de desarrollo económico para los países dedicados a la producción agrícola (IICA 2007).

Debido a la composición de los residuos lignocelulósicos, estos se convierten en una materia prima potencial para la generación de productos de interés comercial y social (Saval 2012). El uso de biocombustibles de primera generación o convencionales, trae problemas de seguridad alimentaria, por lo cual, se han establecido alternativas en la cuales se considera el aprovechamiento de material lignocelulósico (Viñals 2012) para la producción de etanol de segunda generación, como opción bioenergética.

Los biocombustibles de segunda generación, son aquellos que se obtiene a partir de materia prima no alimenticia, proveniente de cultivos enfocados a la alimentación humana y animal, sin competir con la producción de alimentos (Cavieres 2008). El material lignocelulósico es proveniente principalmente de restos de cosecha, siendo la materia prima principal, la biomasa lignocelulósica de maíz y caña de azúcar, ya que presentan en su estructura polímeros, como celulosa, hemicelulosa y lignina, a partir de los cuales es posible obtener azúcares fermentables (IICA 2007). La producción de bioetanol, se enfoca en la fermentación de glucosa obtenida a partir de fuentes de azúcares, por lo tanto, la etapa retorica durante el proceso de obtención de bioetanol se centra en su pretratamiento e hidrólisis, para promover la disponibilidad de los azúcares (Barroso 2010), para esto, el pretratamiento busca solubilizar la hemicelulosa, remover lignina y reducir la cristalinidad de la celulosa presente en la estructura del material lignocelulósico (Castillo 2014).

El pretratamiento del material a ser usado es considerado como un punto crítico a tomar en cuenta ya que esta etapa inicial determina la eficiencia de los microorganismos durante la etapa de fermentación (Nuñez 2011). A lo largo del tiempo se han desarrollado investigaciones de diferentes procesos ya sean mecánicos, físicos y biológicos, para optimizar esta etapa de producción, la hidrólisis con ácido sulfúrico diluido es el pretratamiento más común en la industria para generar Bioetanol lignocelulósico (Guo *et al.* 2008), durante este proceso se toman en cuenta factores influyentes como temperatura, tiempo y concentración de H_2SO_4 , los cuales deben ser controlados para evitar la producción de compuestos tóxicos e inhibidores de la actividad biológica de los

microorganismo destinados para la fermentación y posterior obtención de etanol (Cara *et al.* 2008).

El pretratamiento aplicado en el estudio busca promover el fraccionamiento del material lignocelulósico (rastrojo de maíz), aplicando tratamiento mecánico de trituración, el cual reduce el tamaño de partícula para exponer una mayor área superficial durante el tratamiento químico con ácido sulfúrico (H_2SO_4) diluido y promover la hidrólisis ácida, reduciendo los carbohidratos complejos a azúcares simples disponibles (Cortínez 2010).

Esta investigación consta de los siguientes objetivos:

- Determinar el efecto de la temperatura y concentración de H_2SO_4 H_3PO_4 en la producción de azúcares en el pretratamiento de rastrojos de maíz (*Zea mays*).
- Evaluar la hidrólisis ácida del material lignocelulósico en diferentes concentraciones y temperaturas.
- Optimizar el proceso de hidrólisis para una posterior aplicación en la obtención de bioetanol.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano (LAAZ), de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, ubicado en el departamento Francisco Morazán, Km 30 carretera Tegucigalpa a Danlí, Honduras. El rastrojo de maíz fue proporcionado por el departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria. El material corresponde a un híbrido de la empresa Monsanto, cultivado en los campos de la universidad.

Caracterización del rastrojo de maíz.

Determinación de tamaño de partícula para rastrojo entero y picado, molido y pulverizado. Se determinó el tamaño de partícula del rastrojo entero y picado, para definir si existe diferencia entre estas dos materias primas. Se empleó el AOAC official method 965.22 sorting corn grits. Se pesaron 50 ± 0.1 g de la muestra mezclada. Se colocó la porción pesada en el tamiz inicial número 20 y se ensamblaron los demás tamices en el equipo (30, 40, 60, 100). Se agitó por 5 min, se pesó cada molde con las partículas retenidas y se calculó el peso en cada tamiz para determinar el tamaño de partícula.

Posteriormente se pulverizaron todas las muestras de rastrojo entero y picado en el pulverizador Cyclotec 1093 Sample mil para aumentar el área de contacto con los reactivos. Seguido se homogenizó el rastrojo entero pulverizado y se pesó.

Determinación de humedad de rastrojo de maíz entero y picado. Para la determinación de humedad, se usó el Método AOAC 934.01. Se cortaron los tallos en tamaño de 10 y 15 cm de largo, se pesaron 3.06 kg de rastrojo entero y 0.67 kg de rastrojo picado en bandejas de aluminio previamente secadas e identificadas, usando la balanza OHAUS Defende™. Las muestras se secaron en el horno DOPCO, modelo 630, durante 30 horas a 60 °C. Luego se enfriaron a temperatura ambiente y se pesaron las bandejas más las muestras secas en la balanza Ohaus Heavy duty. Se determinó la humedad aparente del rastrojo de maíz con la siguiente ecuación:

$$\%Ha = \left[1 - \left(\frac{(\text{Peso bandeja} + \text{muestra seca}) - (\text{Peso bandeja vacía})}{(\text{Peso bandeja} + \text{muestra húmeda}) - (\text{Peso bandeja vacía})} \right) \right] \times 100 \quad [1]$$

Donde:

% Ha = Porcentaje de humedad aparente.

Debido a que no se logró extraer toda la humedad a 60 °C, se trituraron las muestras de los tallos secos utilizando el molino de laboratorio marca Thomas Wiley con diámetro de tamiz de 2 mm. Posteriormente con el pulverizador marca Cyclotec 1093 Sample mill, se llegó a un tamaño de 1 mm de diámetro (Alonso 2009), esto para promover una mejor digestibilidad durante la hidrólisis, aumentando el área de contacto de material (Amor *et al.* 2008) Se determinó el contenido de humedad total, usando crisoles de ceramica previamente secados a 105 °C y enfriados en el desecador, se repitió el proceso con la balanza analítica Ohaus adventure. Se ajustó el dato de la humedad con las siguientes ecuaciones:

$$\%Hms = 1 - \left(\frac{(\text{Peso crisol} + \text{muestra seca}) - (\text{Peso crisol})}{(\text{Peso muestra})} \right) \times 100 \quad [2]$$

Donde:

% Hms = Porcentaje de humedad de muestra seca.

$$\%H = \%Ha \left(1 + \frac{\%Hms}{100} \right) \quad [3]$$

Donde:

% H = Porcentaje de humedad total.

% Ha = Porcentaje de humedad aparente.

% Hms = Porcentaje de humedad de la muestra seca.

Análisis fibra ácido detergente con técnica de bolsa de filtro de alimentación (For A200, A200I). Se usó un marcador resistente a solventes para etiquetar la bolsa filtro, se pesó por duplicado y anotó como W1. Se pesaron 0.45 - 0.55 g de muestra preparada (W₂) directamente en la bolsa de filtro. Se selló a 4 mm del borde superior de la bolsa filtro con un sellador de calor.

Se pesó la bolsa en blanco (C₁) para determinar el factor de corrección. Tres bolsas se colocaron por bandeja y luego se apilaron las bandejas en el poste central con cada nivel. El suspendedor con las bolsas se colocó dentro del recipiente analizador de fibras, ANKOM TECHNOLOGY CORP. Se añadieron 1500 mL de solución ácido detergente previamente preparada. Se cerró la tapa y presionó el botón calentar y agitar durante 60 min. La válvula de drenaje se abrió lentamente al principio. Una vez que la solución caliente se agotó se cerró la válvula. Se abrió la tapa y se añadieron 1900 mL de agua destilada de 70 - 90 °C. Se cerró y presionó el agitar y calentar para realizar el enjuague durante 5 min. El enjuague se realizó un total de tres veces, hasta que el pH del agua estuvo neutro. Completado el enjuague se retiraron las muestras. Se presionaron suavemente para retirar el exceso de agua. Se colocaron las bolsas en un beaker de 250 mL con acetona y se cubrieron las bolsas. Se dejaron en remojo durante 3 - 5 min. Las bolsas se retiraron y se dejó evaporar la acetona. Se secaron las bolsas en el horno Fisher Scientific 750 °F a 102 °C ± 2 de 2 - 4 horas. Se enfrió a temperatura ambiente dentro de un desecador y se pesó (W₃). Para determinar la Fibra ácido detergente se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%FAD = \frac{(W3 - (W1 \times C1))}{W2} \times 100 \quad [4]$$

Donde:

W_1 = Peso de la bolsa (g)

W_2 =Peso de muestra (g)

W_3 = Peso seco de la bolsa con fibra después del proceso de extracción (g)

C_1 = Corrección de la bolsa en blanco. (Peso final secado en horno / peso original)

Determinación de lignina ácido detergente en beakers por el Método ANKON TECHNOLOGY 07/02. Después de hacer el análisis de fibra ácido detergente, se colocaron las bolsas secas en un beaker de 3 L y se agregó suficiente cantidad de ácido sulfúrico al 72% para cubrir las bolsas. Se colocó un beaker de 2 L dentro del beaker de 3 L y se mantuvieron las bolsas sumergidas. Se agitaron las bolsas y en intervalos de 30 min se presionaron 30 veces, sumergidas por un periodo total de 3 horas. Después se eliminó el ácido sulfúrico y se lavó con agua destilada caliente para remover todo el ácido. Se repitió el lavado hasta que el pH del agua estuvo neutro. Se sumergieron las bolsas en 250 mL de acetona por 3 min para remover el agua. Se dejó evaporar la acetona a temperatura ambiente y se colocaron las muestras en el horno a 105 ° C por 4 horas. Se sacaron las bolsas del horno y se pusieron en un desecador, se enfrió y pesó (W_3). Luego se colocaron en la mufla a 525 °C por 3 horas en crisoles previamente secados, se dejó enfriar y se pesó (W_4). Finalmente se calculó la corrección de cenizas de la bolsa blanco (C_1). Para determinar el porcentaje de Lignina Acido Detergente (LAD), se aplicaron las siguientes ecuaciones:

$$\%LAD(base) = \frac{(W3 - (W1 \times C1))}{W2} \times 100 \quad [5]$$

$$\%LAD(DM \text{ base}) = \frac{(W3 - (W1 \times C1))}{W2 \times DM} \times 100 \quad [6]$$

$$\%LAD \text{ OM}(DM \text{ base}) = \frac{(W4 - (W1 \times C2))}{W2 \times DM} \times 100 \quad [7]$$

Donde:

W_1 = Peso de la bolsa de tara

W_2 = Peso de la muestra

W_3 = Peso después del proceso de extracción

W_4 = Peso de la materia orgánica

C_1 = Corrección de la bolsa blanco

C_2 = Corrección de ceniza blanco

Fibra neutro detergente con técnica de bolsa de filtro de alimentación (For A200, A200I). Para determinar Fibra Neutro Detergente (FND), se preparó una solución con 30 g Dodecil sulfato de sodio, 18.61 g de sal de Etilendiamina tetraacético disodio di hidratado, 6.81 g de Borato de sodio, 4.56 g de fosfato de sodio di básico anhídrido y 10 ml de trietilenglicol en 1 L de agua destilada, luego se verificó el pH de 6.9 - 7.1, se agitó y calentó para promover la dilución.

Se usó un marcador resistente a los solventes para etiquetar la bolsa filtro, se pesó la bolsa filtro (W1) y se taró la balanza, luego se pesaron 0.45 - 0.55 g de muestra preparada (W2) directamente en la bolsa de filtro, por duplicado y se selló dejando 4 mm en la parte superior de la bolsa. Se pesó una bolsa en blanco y se incluyó en el procedimiento para determinar el factor de corrección (C1), se colocaron las nueve bandejas dentro del equipo con tres bolsas por bandeja y se agregó 1500 mL de solución neutro detergente, se agregó 20 g de sulfito de sodio y 4 ml de alfa-amilasa a la solución; se cerró y se encendió el agitador y calentador por un período de 75 min. Luego se apagó y se abrió la válvula de drenaje para descargar la solución caliente, una vez descargado, se cerró la válvula, se abrió la tapa y se agregó 1900 mL de agua destilada (70 - 90 °C) y 4 mL de alfa-amilasa para el primero y segundo lavado, luego se encendió la agitación y calentamiento por 5 min con la tapa cerrada, una vez terminado esto se descargó la solución y se repitió el mismo procedimiento de lavado por tres veces. Una vez completado el lavado, se retiraron las muestras y el exceso de agua, se colocaron las bolsas en un beaker de 250 mL y se agregó suficiente acetona para cubrir las bolsas durante 3-5 min, se removieron las bolsas de la acetona y se dejaron a temperatura ambiente para evaporar la acetona residual. Posteriormente se colocaron las muestras al horno a 102 ± 2 °C por 2 a 4 horas, se retiraron las bolsas del horno y se colocaron en un desecador para dejarlas enfriar a temperatura ambiente y luego se pesaron las bolsas (W3).

Para determinar el porcentaje de Fibra Neutro Detergente se aplicó la siguiente ecuación:

$$\%NDF = \frac{(W3 - (W1 \times C1))}{W2} \times 100 \quad [8]$$

Dónde:

W1: Peso de la bolsa (g)

W2: Peso de la muestra (g)

W3: Peso seco de la bolsa con fibra después del proceso de extracción (g)

C1: Corrección de la bolsa del blanco (peso seco de la bolsa del blanco/ peso original de la bolsa del blanco).

Para determinar Hemicelulosa, Celulosa y Lignina del rastrojo de maíz se empleó las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \%FND - \%FAD \quad [9]$$

$$\% \text{ Celulosa} = \%FAD - \%LAD \quad [10]$$

$$\% \text{ Lignina} = \%LAD \quad [11]$$

FASE I:

Ensayos iniciales: Estos estudios se basaron en la revisión de literaturas:

Ácido fosfórico.

- Estudio del efecto de tipo, concentración de ácido y tiempo de digestión en hidrólisis de camote (*Ipomoea batatas*): donde el tratamiento óptimo para la digestión de forraje de camote fue el ácido fosfórico al 2% p/v por 60 min a 80 °C (Alonso 2009).
- Ethanol production from sweet sorghum residual: la condición óptima de hidrólisis con ácido fosfórico fue de 80 g/L (4.7% v/v) con tiempo de 80 min a 120 °C (Ban 2008).

Ácido sulfúrico.

- Efecto de la temperatura y la concentración de H₂SO₄ en la producción de azúcares y 5 hidroximetilfurfural en el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar: La solubilización total de hemicelulosa y mayor rendimiento de azúcares fermentables se obtuvo con el pretratamiento de 6% v/v a 120 °C por 120 min (Mazariegos 2013).
- Modelo cinético de la hidrólisis del residuo de cosecha cañero: el método eficaz para solubilizar carbohidratos presentes fue la concentración de ácido a 1.5% p/p a 160 °C por 39 min (Aguilar 2010).

Pretratamiento con ácido diluido. Se pesó una muestra de 5.5 ± 0.03 g de rastrojo entero pulverizado en papel encerado y se colocó dentro de los tubos de digestor Kjeltec 8100 Foss rotulados con la concentración de ácido a evaluar. Posteriormente se agregó la solución del ácido con su respectiva dilución en relación 1:20 (Materia seca: solución de ácido) (Mazariegos 2013).

Los tubos se colocaron en el digestor Kjeltec 8100 Foss, donde se colocó el tiempo y temperatura de acuerdo al pre tratamiento. Después de la hidrólisis térmica, se hizo un doble filtrado del contenido de cada tubo utilizando un embudo, papel filtro, matraz erlenmeyer de 250 mL y se anotó el volumen del hidrolizado. En el cuadro 1 se describen los pretratamientos.

Cuadro 1. Pretratamientos de hidrólisis ácida basada en revisión de literatura.

Pretratamiento	Concentración %	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Ácido Sulfúrico	6.0 v/v	120	120
	1.5 p/p	160	39
Ácido Fosfórico	2.0 p/v	80	60
	4.7 v/v	120	80

Fuente: (Mazariegos 2013), (Aguilar 2010), (Alonso 2009) y (Ban 2008).

Determinación cualitativa de azúcares reductores por el método de Somogyi Nelson.

Para determinación de azúcares reductores se preparó un reactivo alcalino que consiste en disolver 25 g de Na_2CO_3 , 25 g de $\text{KNaO}_6\text{C}_4\text{H}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 20 g de NaHCO_3 y 200 g de Na_2SO_4 , en 700 mL de agua destilada y se llevó a un volumen de 1 L. Luego se disolvió 6 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 40 mL de agua destilada y se añadió una gota de H_2SO_4 concentrado, finalmente, se combinaron ambas soluciones. Para el reactivo de Nelson, se disolvió 25 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 450 mL de agua destilada y se añadió 21 mL de H_2SO_4 concentrado, luego se agregó 3 g de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, disuelto en 25 mL de agua. Se mezcló e incubó a 37 °C por 24 horas, para formar el compuesto cromogénico. Para la curva estándar de glucosa, se preparó una solución de glucosa 100 ppm, se pesó 0.1 g de D-Glucosa y se llevó a un volumen de 1 L con agua destilada. Luego se tomó con una pipeta 10, 20, 40, 60, 80 mL de solución stock de glucosa en balones de 100 mL y se llevó hasta dicho volumen con agua destilada, para formar las concentraciones respectivas en ppm de glucosa. Una vez preparados todos los reactivos, se procedió a pipetear en tubos de ensayo lo siguiente, 1 mL de agua destilada por cuadruplicado para el blanco, 1 mL de cada dilución por duplicado para la curva estándar de glucosa y 1 mL de la dilución 10^2 de cada muestra por duplicado, luego se agregó 1 mL de reactivo alcalino a todos los tubos y se agitó en el vórtex, se calentaron los tubos a 100 °C por 22 min y se enfriaron en un recipiente con agua, se agregó 1 mL de reactivo de Nelson a todos los tubos y se agitaron, posteriormente se leyeron las absorbancias del blanco, de la curva estándar y de las muestras en el espectrofotómetro Spectronic Genesys TM5, a una longitud de onda de 540 nm. El porcentaje de glucosa se determinó por la siguiente ecuación:

$$\% \text{Glucosa} = \frac{[\text{ppm Glucosa}] \times FD \times 100}{\text{Peso de muestra} \times 10^6} \quad [12]$$

Donde:

FD: Factor de dilución

Determinación de Brix y pH. Se midieron los °Brix y pH de cada hidrolizado, usando el refractómetro ATAGO Quality Refractometers/ Polarimeter y el medidor de pH Orion 3-Star.

Diseño experimental. Para determinar el mejor tratamiento a partir de las pruebas preliminares, se aplicó una separación de medias Tukey, a través del programa Statistical Analysis System (SAS Versión 9.4).

FASE II:

Para evaluar las variables independientes, temperatura de hidrólisis y concentración del ácido aplicado, se utilizó una metodología experimental de superficie respuesta con un diseño compuesto central rotacional (DCCR) de segundo orden con una probabilidad de significancia del 10% (Cevallos 2015). Los parámetros del proceso fueron codificados (-1, 0, 1) y se calcularon de acuerdo a la ecuación:

$$x_i = (X_i \times Z \Delta x_i) \quad [13]$$

Dónde:

x_i = Valor codificado de la variable x_i

X_i = Valor real de la variable

Z = Valor real de la variable en el punto central

Δx_i = Valor del intervalo de la variable x_i

Para el modelo se establecieron dos niveles de variables axiales, codificados como $+\alpha$ y $-\alpha$. Los valores para α , dependen del número factorial ($F=2^k$) y del número de variables independientes ($K=2$) del diseño, definidos por la ecuación:

$$\pm \alpha = (F)^{1/4} = (2K)^{1/4} = (2 \times 2)^{1/4} = 1.4142 \quad [14]$$

El número de tratamientos para los ensayos, se basaron en un diseño factorial completo definido por la ecuación:

$$n = 2^k + 2k + m \quad [15]$$

Donde:

Los tratamientos se describen en el cuadro 2.

Cuadro 2. Descripción del diseño experimental.

Expresiones	Cantidad de tratamientos	Puntos
$2^K = 2^2$	4	Factoriales
$2K = 2 \times 2$	4	Axiales
m	4	Centrales
Total	12	Unidades experimentales

Fuente: Cevallos 2015, adaptado por el autor.

En este estudio se consideró a los puntos axiales como tratamientos de control pues representan los valores máximos y mínimos para el procesamiento del material lignocelulósico y obtención de hidrolizado en este estudio.

La amplitud en el rango para las variables se determinó con los resultados obtenidos de ensayos iniciales tanto para temperatura y concentración de ácido sulfúrico, así como de literatura consultada. Para el análisis de los resultados en este estudio se determinó el comportamiento en cuanto a combinación de variables independientes (X^k) y variables dependientes o respuestas (Y_i), descrito por el método.

Cada respuesta se ajustó a través de un análisis de regresión lineal con un polinomio cuadrático con las variables (X_k) para cada respuesta (Y). El término general utilizado para predecir el comportamiento de cada respuesta se describe en la ecuación:

$$Y_i = (\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \varepsilon) \quad [16]$$

Dónde:

Y_i = Función respuesta.

β_0 = Coeficiente relativo a la interpretación con la respuesta en el eje.

X_1 y X_2 = Valores de las variables independientes.

β_1 y β_2 = coeficientes lineales estimados por el mínimo cuadrado.

β_{11} y β_{22} = Coeficientes para variables cuadráticas.

β_{12} = Coeficiente de interacción entre variables independientes

ε = Error experimental

En el cuadro 3 se muestran los niveles codificados para los puntos centrales, factoriales y axiales de las variables independientes.

Cuadro 3. Niveles codificados de las variables independientes del experimento.

Variables	Niveles				
	-1.41	-1	0	1	+1.41
X_1 : Temperatura	104.00	109.00	120.00	131.00	136.00
X_2 : Concentración	4.59	5.00	6.00	7.00	7.41

Fuente: Rodrigues y Lemma 2012, adaptado por los autores.

En el cuadro 4 se muestran los valores codificados y reales del diseño experimental completo con dos variables independientes. Las variables dependientes que se evaluaron en cada tratamiento fueron: pH, °Brix, Azúcares totales, Glucosa, Galactosa y Fructosa.

Cuadro 4. Composición del diseño experimental, valores codificados y reales para cada tratamiento.

Tratamientos	Valores codificados		Valores reales	
	X ₁	X ₂	Temperatura (°C)	Concentración (% v/v)
1	-1	-1	109	5.0
2	-1	1	109	7.0
3	1	-1	131	5.0
4	1	1	131	7.0
5	-1.41	0.00	104	6.0
6	1.41	0.00	136	6.0
7	0.00	-1.41	120	4.6
8	0.00	1.41	120	7.4
9 ©	0	0	120	6.0
10 ©	0	0	120	6.0
11 ©	0	0	120	6.0

©: Punto central del experimento.

Fuente: Chariguaman 2015, adaptado por los autores.

Análisis estadístico. Para analizar las variables independientes codificadas y reales se utilizó el programa Statistica versión 7.0, a partir del cual se expresaron por completo las variables independientes codificadas para determinar el análisis de varianza, coeficientes de regresión y variables independientes reales usadas para la obtención de las gráficas de superficie respuesta aplicados para cada variable independiente. Para la interpretación de los datos y para que el modelo sea denominado predictivo se utilizó un R^2 mayor a 0.6 y los modelos que presentaron un R^2 menor a 0.6 se consideraron tendenciosos (Chariguamán 2015).

Se hizo un análisis de prueba de varianza (ANOVA) empleando un F con 5% de nivel de significancia, por lo que un modelo de regresión se considera significativo cuando el valor de F calculado es mayor o igual que el F tabular, mientras mayor sea el F calculado el modelo será más predictivo (Rodrigues y Lemma 2012).

En la figura 1 se detalla gráficamente los niveles codificados de las variables independientes tomadas en cuenta para el estudio, con los valores reales para cada tratamiento.

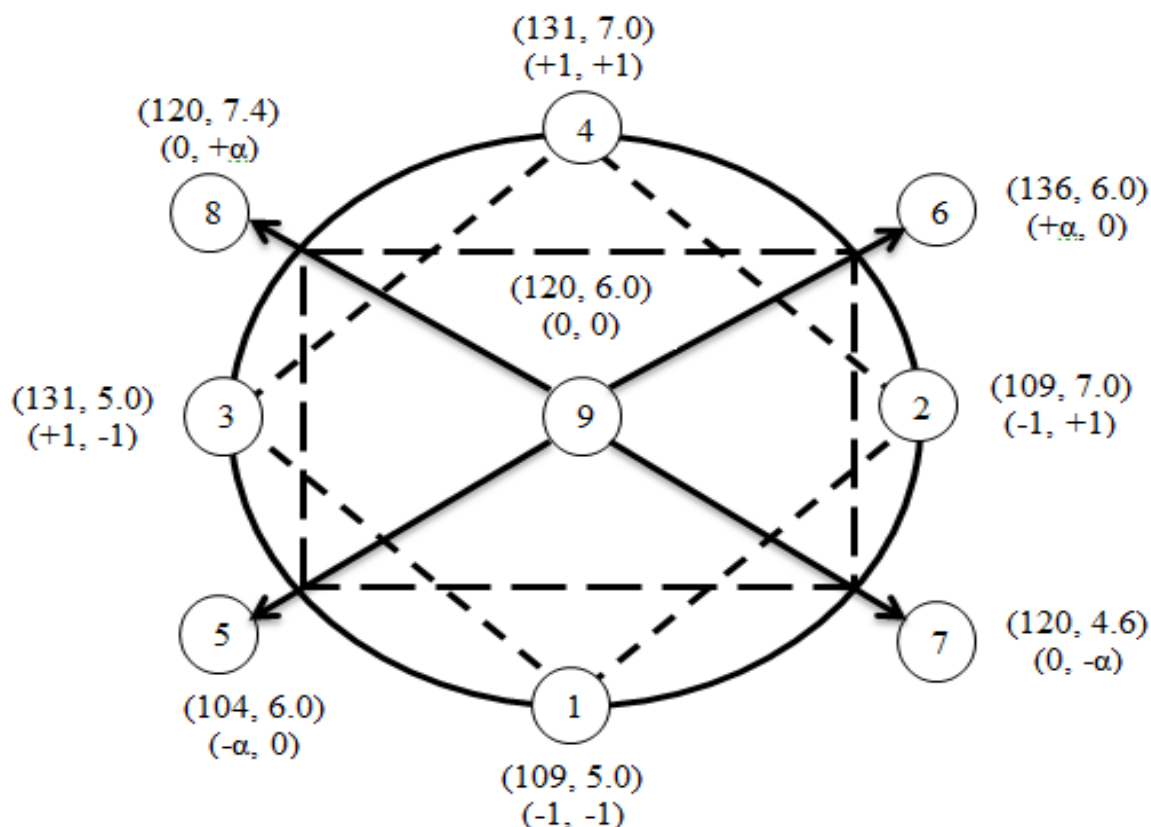


Figura 1. Niveles codificados del experimento. 1-4: Puntos factoriales, 5-8: Puntos axiales, 9: Punto central.

Fuente: Rodrigues y Lemma 2012, adaptado por los autores.

Pretratamiento de ácido diluido en la Fase II. Se pesó una muestra de 5.5 g de materia seca de rastrojo de maíz pulverizado y se colocó dentro en los tubos del digestor Kjeltec 8100 Foss rotulando cada tubo con su respectiva concentración de ácido sulfúrico (5, 7, 4.6, 7.4 y 6 %). Luego se agregó la dilución de ácido sulfúrico en relación 1:20 (materia seca: dilución). Los tubos se colocaron en el digestor durante 2 horas para todos los tratamientos. A temperaturas de 109, 131, 104, 136 y 120 °C dependiendo del tratamiento. Posteriormente se dejó enfriar por una hora, se filtró tres veces utilizando un embudo, papel filtro y un matraz Erlen meyer de 125 mL, registrando el volumen obtenido de cada hidrolizado. Después se tomó 10 mL de hidrolizado con una pipeta volumétrica y se neutralizó a pH 7.0 con solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1 N, se aforó en matraces volumétricos de 100 mL con agua destilada y se refrigeró a 4 °C (Contreras 2011).

Determinación de perfil de azúcares reductores por HPLC con el método AOAC 982.14. El hidrolizado de rastrojo de maíz se acondicionó a temperatura ambiente de 24 °C y se verificó el pH de 7. Luego se centrifugó cada muestra a 600 rpm por 4 minutos, se inyectó cada muestra en los viales con una jeringa de 0.45 µm PTEF, se colocaron en un vial para muestras de 1.5 mL y se hicieron las lecturas en el HPLC. Las condiciones cromatografías fueron: columna Hi-plex Ca 300 x 7.7 mm, volumen de 20 µL, temperatura

de la columna 85 °C y fase móvil H₂O desionizada, velocidad de flujo 0.6 mL/min, tiempo de corrida 30 minutos y detector IR (Contreras 2011). La cuantificación se hizo reemplazando el área bajo la curva (y) en la ecuación de la curva de calibración correspondiente al compuesto, el resultado obtenido (x) en mg/mL de hidrolizado se multiplicó por el factor de dilución para realizar la conversión a mg de azúcar/g de materia seca de rastrojo de maíz, se dividió entre 10 para convertir el resultado y reportarlo como g de azúcar/ 100g de rastrojo (Ixcotoyac 2013).

Determinación de Brix y pH. Se midió los ° Brix usando un refractómetro óptico RTM-03 CCA0105 con escala de 0 - 32 a temperatura de 9.8 °C por triplicado y el pH usando un medidor de pH Orion 3- Star tres veces.

FASE III:

Tomando en cuenta las condiciones de temperatura y concentración de H₂SO₄, definidas por la función de utilidad, se reprodujo el tratamiento óptimo por duplicado, hidrolizando el rastrojo de maíz por dos horas y posteriormente se hizo un análisis de perfil de azúcares por HPLC y se determinaron los valores de pH y °Brix, siguiendo la metodología antes descrita.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de materia prima.

Determinación de tamaño de partícula del rastrojo de maíz. En el cuadro 5 se presentan los datos obtenidos en la determinación de tamaño de partícula del rastrojo de maíz entero molido y entero pulverizado.

Cuadro 5. Determinación de tamaño de partícula de Rastrojo Entero molido y pulverizado.

Número de Tamiz	Tamaño de partícula (mm)	Peso tamiz (g)	Rastrojo molido		Rastrojo Pulverizado	
			Peso tamiz + rastrojo (g)	Muestra retenida (g)	Peso tamiz + rastrojo (g)	Muestra retenida (g)
20	0.85	390	440	50	420	30
30	0.60	370	370	0	380	10
40	0.42	360	360	0	360	0
60	0.25	340	340	0	340	0
100	0.15	320	320	0	320	0
Base	-	360	360	0	360	0

Fuente: Cevallos y Chariguaman 2016, adaptado por los autores.

En el cuadro 6 se presenta la determinación del tamaño de partícula en rastrojo de maíz picado molido y picado pulverizado.

Cuadro 6. Determinación de tamaño de partícula de rastrojo picado molido y pulverizado.

Número de Tamiz	Tamaño de partícula (mm)	Peso tamiz (g)	Rastrojo molido		Rastrojo Pulverizado	
			Peso tamiz + rastrojo (g)	Muestra retenida (g)	Peso tamiz + rastrojo (g)	Muestra retenida (g)
20	0.85	390	440	50	440	50
30	0.60	370	370	0	370	0
40	0.42	360	360	0	360	0
60	0.25	340	340	0	340	0
100	0.15	320	320	0	320	0
Base	-	360	360	0	360	0

Fuente: Cevallos y Chariguaman 2016, adaptado por los autores.

De acuerdo con los datos obtenidos tanto para el cuadro 5 como para el 6, se determinó que el tamaño de partícula tanto para rastrojo picado molido y entero molido, tuvo un tamaño

de partícula de 0.85 mm, sin registrar porcentaje de pérdida en los demás tamices, sin embargo, para el rastrojo entero y pulverizado se registró 60% con tamaño de partícula de 0.85 mm y 20% con un tamaño de partícula de 0.60 mm, además se registró una pérdida del 20% de la cantidad de materia prima inicial, entre tamices. Se seleccionó como materia prima al rastrojo entero y pulverizado con un tamaño de partícula de 0.85 mm, lo que garantiza una mayor área superficial expuesta que facilita la hidrólisis de los próximos tratamientos (Aguilar 2011).

Determinación de humedad de rastrojo de maíz entero y picado. En el cuadro 7 se observa el análisis de humedad del rastrojo de maíz. Se muestra que hay 10.28 y 10.97% de humedad para rastrojo entero y rastrojo picado respectivamente, los resultados coincidieron a los reportados por Mazariegos 2013, estudio en el que se determinó 10% de humedad en el material lignocelulósico a tratar. Es importante tener en consideración que las características de humedad total varían de acuerdo al tipo de material lignocelulósico, la edad fisiológica de la planta y las condiciones en las que creció como tipo de suelo, frecuencia de riego, incidencia de plagas entre otras (Alonso 2009).

Cuadro 7. Humedad del Rastrojo de maíz entero, pulverizado y maíz picado, pulverizado.

Materia	Humedad (%) $\pm$ D.E.
Rastrojo picado y pulverizado	10.90 $\pm$ 0.25
Rastrojo entero y pulverizado	10.29 $\pm$ 0.34

D.E.: Desviación estándar

Fuente: Cevallos y Chariguaman 2016, adaptado por los autores.

Determinación de porcentaje de FAD, FND, LAD, Hemicelulosa, Celulosa y Lignina.

En el cuadro 8 se muestran los análisis de FND, FAD y LAD. Se determinó que el rastrojo de maíz empleado contiene 47.74% celulosa, 19.77% hemicelulosa y 8.09% de lignina; los resultados coincidieron a lo reportado por Mazariegos (2013) con 47.6% de celulosa en su materia prima. Un estudio similar con bagazo de caña reportó 19.48% de hemicelulosa y 8.7% lignina (Bernier y Rincón 2012). El Hage *et al.* (2010), obtuvo 45% celulosa, 25% hemicelulosa y 27% lignina, estos resultados son parecidos a los reportados en este documento, variando notablemente en el contenido de lignina. Es interesante resaltar que, la diferencia de lignina se atribuye al tipo de biomasa y el estado de madurez de la misma (Treviño *et al.* 2011). Otros estudios que tomaron en cuenta la composición estructural del tallo del maíz reportaron que el material presenta 70.93% de FND y 44.52% de FAD (Holgado *et al.* 2010), los mismos que se asemejan con los datos obtenidos en este estudio.

Cuadro 8. Composición química de Rastrojo de maíz.

Componente	Porcentaje (%) $\pm$ D.E.
FAD	55.84 $\pm$ 0.55
FND	75.60 $\pm$ 0.07
LAD	8.09 $\pm$ 0.85
Hemicelulosa	19.77 $\pm$ 0.13
Celulosa	47.74 $\pm$ 0.99
Lignina	8.09 $\pm$ 0.85

D.E.: Desviación estándar

Fuente: Cevallos y Chariguaman 2016, adaptado por los autores.

Resultados de FASE I. En el cuadro 9 se muestran los resultados para absorbancia. Se determinó una $P < 0.05$ que indica diferencia significativa entre tratamientos, siendo el mejor el H_2SO_4 6% con 120 °C. El R^2 indica que el 72% de los resultados se ajustan al modelo, considerando la concentración del ácido. Además, existe una variación de C.V. = 41.01 en los tratamientos. En los resultados obtenidos se muestra que a mayor concentración de ácido sulfúrico, la absorbancia aumenta. En este estudio preliminar se determinó cuál tratamiento presenta una mayor absorbancia en cuanto a Glucosa. Se considera que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de moléculas a estudiar, es decir que habrá mayor interacción de la luz a medida que aumente la concentración de las mismas (Díaz *et al.* 2006).

Cuadro 9. Análisis de varianza de la absorbancia en cada tratamiento con ácido sulfúrico y ácido fosfórico.

Tratamientos	Absorbancia (nm) $\pm$ D.E.
H ₂ SO ₄ 6%	0.774 a
H ₂ SO ₄ 1.5%	0.403 ab
H ₃ PO ₄ 2%	0.278 b
H ₃ PO ₄ 4.7%	0.250 b
C.V.:	41.016
R²:	0.722

C.V.: Coeficiente de variación

D.E.: Desviación estándar

nm: nanómetros

Fuente: Cevallos y Chariguaman 2016, adaptado por los autores.

En el cuadro 10 se muestran los resultados para pH en donde se obtuvo una $P < 0.05$ que indica diferencia significativa entre tratamientos. El mejor tratamiento fue H_3PO_4 2% p/v a 80 °C ya que presenta el mayor valor en pH, sin embargo, se selecciona el tratamiento H_2SO_4 al 6% porque presenta mayores valores en absorbancia y °Brix. El R^2 indica que 99% de los resultados se ajustan al modelo y tienen una correlación alta negativa en base a

concentración de ácido, indicando que a menor concentración de ácido mayor pH. Además existe baja variación entre las repeticiones de cada tratamiento (C.V. = 0.56).

Cuadro 10. Análisis de varianza de pH en cada tratamiento con ácido sulfúrico y ácido fosfórico.

Tratamientos	pH $\pm$ D.E.
H ₃ PO ₄ 2%	1.72 $\pm$ 0.004 a
H ₃ PO ₄ 4.7%	1.38 $\pm$ 0.01 b
H ₂ SO ₄ 1.5%	0.95 $\pm$ 0.01 c
H ₂ SO ₄ 6%	0.37 $\pm$ 0.01 d
C.V.:	0.56
R²:	0.99

C.V.: Coeficiente de variación

D.E.: Desviación estándar

Fuente: Cevallos y Chariguaman 2016, adaptado por los autores.

El pH de un ácido fuerte en función de la concentración en soluciones diluidas sigue un patrón, a menores concentraciones de ácido aumenta el pH (Romero *et al.* 2005). El ácido fosfórico es débil en relación al ácido sulfúrico que es un ácido fuerte (U.A. s.f) lo que implica que mientras más fuerte es un ácido el pH es bajo respecto al débil (Sánchez *et al.* 2013). El hidroximetilfurfural (HMF) es uno de los compuestos formados por la degradación de productos azucarados, particularmente por deshidratación de la fructosa y aparece en forma espontánea aumentando su concentración en relación al tiempo y otros factores como la acidez del material, además se considera que a mayor acidez de la materia mayor concentración de HMF en función del tiempo. (Subovsky *et al.* 2012) mencionan que por tal razón los resultados se centran en obtener un pH alto que minimice la producción de subproductos tóxicos para la levadura (Kuster 1976).

Los resultados en el cuadro 11 para °Brix, muestran una $P < 0.05$ que indica diferencia significativa entre tratamientos. El tratamiento seleccionado fue H₂SO₄ 6% v/v a 120 °C ya que muestra la mayor cantidad de sólidos totales. El R² indica que 99% de los resultados son explicados por el modelo y tienen alta correlación en concentración de ácido con °Brix. Los resultados muestran que a mayor concentración de ácido mayor valor de °Brix, además existe baja variación entre las repeticiones de un tratamiento (C.V.= 1.323). Lopatinsky (2008) reporta 8 °Brix después del proceso de sacarificación con enzimas α -amilasa, aplicadas en almidón de maíz comparado con 9.85 ° Brix obtenidos en este estudio después del pretratamiento con H₂SO₄ en rastrojo de maíz. En hojas de eucalipto Reyes *et al.* (2014) reportaron valores bajos de 3.70 y 5.02 ° Brix obtenido por hidrólisis ácida a 1% de H₂SO₄ por lo que se determina que la concentración de ácido influye en los valores para °Brix.

Cuadro 11. Análisis de varianza de ° Brix en cada tratamiento con ácido sulfúrico y ácido fosfórico.

Tratamientos	°Brix ±D.E
H ₂ SO ₄ 6%	9.85 ± 0.05 a
H ₃ PO ₄ 4.7%	3.97 ± 0.04 b
H ₂ SO ₄ 1.5%	2.25 ± 0.05 c
H ₃ PO ₄ 2%	1.55 ± 0.05 d
C.V.:	1.32
R ² :	0.99

C.V.: Coeficiente de variación

D.E.: Desviación estándar

Fuente: Cevallos y Chariguaman 2016, adaptado por los autores.

Resultados obtenidos en FASE II:

pH del hidrolizado. El pH aumentó a medida que se reduce el porcentaje de concentración de ácido sulfúrico, sin embargo la temperatura durante el procesamiento no tuvo efecto en la variación de este parámetro (figura 2).

La variable cuadrática de concentración fue significativa a una $P < 0.10$ en el cuadro 12, demostrando un efecto de disminución del valor de pH a medida que aumenta la concentración de ácido sulfúrico. La variable de temperatura no tuvo influencia sobre el valor de pH, con una $P > 0.10$. La interacción entre ambas variables fue significativa a una $P < 0.10$, lo que indica que la distribución de valores de una de las dos variables difiere en función de los valores de la otra (Molina y Rodrigo 2010). El coeficiente de determinación R^2 , esta sobre 0.60, demostrando que 75.8% de los datos se ajustaron al modelo y 24.2% no fueron explicados mediante el análisis. La falta de ajuste fue significativa con un $P < 0.10$ y el F calculado fue mayor al F tabular, por lo tanto, el modelo presentó un comportamiento tendencioso.

Cuadro 12. Coeficientes de regresión, probabilidad, valores F y R² para pH, en función de la temperatura y concentración de H₂SO₄, durante el pretratamiento de material lignocelulósico.

Factor	pH	p
Intercepto	5.23E-01	7.70E-04●
X ₁	4.84E-03	6.41E-01
X ₁ ²	2.08E-03	8.62E-01
X ₂	-1.09E-01	6.64E-03●
X ₂ ²	-4.04E-02	6.23E-02●
X ₁ *X ₂	-6.75E-02	3.30E-02●
Falta de ajuste		4.79E-02●
R ²		0.75813
F calculado> F tabular		72.155>4.01

X₁: Temperatura (°C), X₂: Concentración de H₂SO₄, ●: Significativo para una P<0.10

La siguiente ecuación matemática representa el pH, basado en los resultados significativos del cuadro 12.

$$\text{pH} = 0.52 - 0.11X_2 - 0.04X_2^2 - 0.07X_1 \cdot X_2 \quad [17]$$

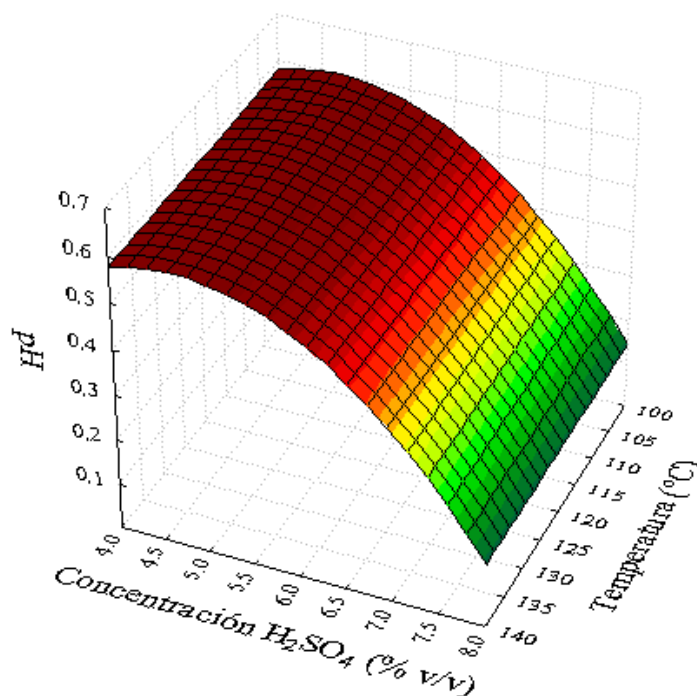


Figura 2. Efecto de concentración de ácido y temperatura el pH del hidrolizado de rastrojo de maíz.

El gráfico de superficie respuesta de la figura 2 para pH, se hizo basado en la ecuación 17. Se observa una relación inversamente proporcional, a medida que disminuye la concentración de ácido sulfúrico (H_2SO_4) aumenta el valor de pH, alcanzando valores de 0.50 a 0.58 aproximadamente, bajo condiciones determinadas de concentración. En un estudio de optimización del pretratamiento ácido para la obtención de azúcares fermentables para producción de bioetanol no se reporta el valor de pH y se ajusta a 4.8 con buffer acetato de sodio, se considera que se obtuvo un valor superior al nuestro y se atribuye a la concentración de ácido empleado de 0.3% H_2SO_4 (Dagnino *et al.* 2012). Reyes *et al.* (2014) con 1% H_2SO_4 , reportó un pH de 2.31 para el hidrolizado de hojas de *Eucalyptus camaldulensis* Dhnh a una temperatura de 37 °C, aplicando ultrasonido.

En el pretratamiento de material lignocelulósico no solo se obtienen los azúcares provenientes de la hidrólisis y solubilización de la celulosa y hemicelulosa. Las altas temperaturas y condiciones ácidas originan otros compuestos como: derivados de furanos, ácidos alifáticos y derivados fenólicos (Pampulha y Diaz 1989) que son potenciales inhibidores de la fermentación. La naturaleza y concentración de estos compuestos depende del tipo de materia prima, pretratamiento utilizado, condiciones del proceso (temperatura) (Pulido *et al.* 2013). Era de esperar que los resultados del hidrolizado arrojaran pH bajos de la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento pues éste depende de la composición de lignocelulosa que varía entre las especies de plantas, edad y etapa de crecimiento (Jeffries 1994). Por ejemplo, los hidrolizados procedentes del pretratamiento de maderas duras tienen mayor concentración de furfural y ácido acético que un hidrolizado obtenido de maderas blandas, debido al contenido mayor en pentosas y restos acetilados de hemicelulosas en maderas duras (Pulido *et al.* 2013). Kuster *et al.* (1976) reporta que a un pH >3.9 no se forma hidroximetilfurfural (HMF) y un pH >2.7 no forma ácido levunílico, concluyendo que valores altos disminuyen la formación de HMF.

Grados Brix. Los grados Brix aumentaron a medida que aumentó la concentración de ácido sulfúrico, además la disminución en temperatura promueve el aumento de grados brix (figura 3).

La variable lineal y cuadrática de concentración fue significativa a una $P < 0.10$ en el cuadro 13, demostrando un efecto de aumento en los grados Brix a medida que aumenta la concentración de ácido sulfúrico. La variable lineal y cuadrática de temperatura fue significativa a una $P < 0.10$, determinado que a medida que se reduce la temperatura los grados Brix aumentan pero en mínima proporción en comparación a la influencia de la concentración sobre los valores de esta variable dependiente. La interacción entre ambas variables fue significativa a una $P < 0.10$, lo cual indica que la variación en el valor de una de las dos variables afecta en los valores de la otra (Molina y Rodrigo 2010). El coeficiente de determinación R^2 , esta sobre 0.60, demostrando que 71% de los datos se ajustaron al modelo y 29% no fueron explicados mediante este análisis. La falta de ajuste fue significativa con un $P < 0.10$ y el F calculado fue mayor al F tabular, por lo tanto, el modelo presentó un comportamiento tendencioso.

Cuadro 13. Coeficientes de regresión, probabilidad, valores F y R² para ° Brix, en función de la temperatura y concentración de H₂SO₄, durante el pretratamiento de material lignocelulósico.

Factor	°Brix	p
Intercepto	9.80E+00	3.47E-05•
X ₁	-3.68E-01	9.09E-03•
X ₁ ²	-4.38E-01	9.13E-03•
X ₂	1.87E+00	3.59E-04•
X ₂ ²	8.88E-01	2.24E-03•
X ₁ *X ₂	4.75E-01	1.09E-02•
Falta de ajuste		1.96E-03
R ²		0.70913
F calculado> F tabular		632.83> 9.37

X₁: Temperatura (°C), X₂: Concentración de H₂SO₄, •: Significativo para una P<0.10

La siguiente ecuación matemática representa los ° Brix, basado en los resultados significativos del cuadro 13.

$$^{\circ}\text{Brix} = 9.80 - 0.37X_1 - 0.44X_1^2 + 1.87X_2 + 0.89X_2^2 + 0.48X_1 \cdot X_2 \quad [18]$$

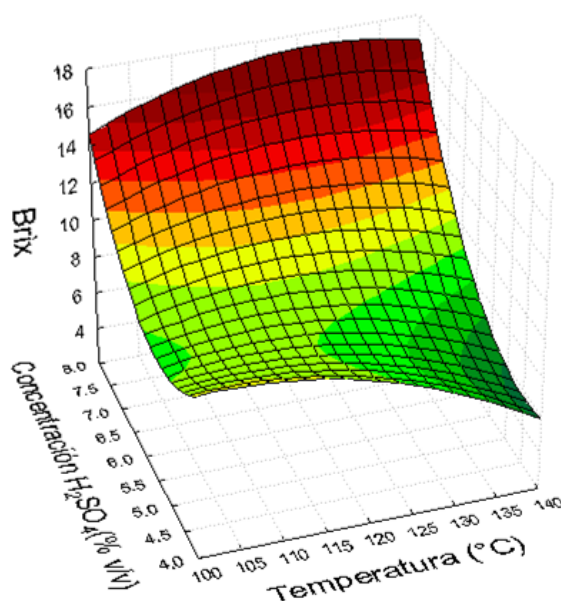


Figura 3. Efecto de temperatura y concentración de ácido sobre los °Brix del hidrolizado de rastrojo de maíz.

El gráfico de superficie respuesta de la figura 3 para los grados brix se hizo con la ecuación 18. Esta muestra una relación directamente proporcional, ya que a medida que aumenta la

concentración de ácido sulfúrico (H_2SO_4) aumentan los grados Brix alcanzando valores entre 16 a 17 con incremento de temperatura hasta 120-125 °C aproximadamente. La medición de °Brix es un buen estimador del contenido de azúcares presentes, ya que representa más del 90% de materia soluble en el hidrolizado. Mayor concentración de ácido diluido solubiliza la hemicelulosa facilitando la conversión del sustrato en azúcares fermentables como glucosa o fructosa (Chandler *et al.* 2012), a comparación de los grados brix de la materia prima después del pretratamiento, en donde su valor aumenta. Esto coincide con Reyes *et al.* (2014) quien reportó un incremento de 4 a 5.02 °Brix después del pretratamiento con ácido sulfúrico al 1% y 120 °C.

Sin embargo, el valor es bajo respecto a los resultados reportados en este estudio a causa de la concentración de ácido. Jacques *et al.* (2003) expone que elevados grados brix en soluciones impiden la fermentación de azúcares por los microorganismos debido a la alta presión osmótica ejercida sobre sus paredes por lo que es necesario la dilución a 25 grados brix o menores pues a mayores valores se tiene un inicio lento de la fermentación y puede provocar contaminación bacteriana. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* presenta una tolerancia a los sólidos totales de 24 grados brix (Tames *et al.* 2015). Por esta razón es necesario °Brix bajo de 25 lo que hace efectivo el pretratamiento químico empleado.

Glucosa. El porcentaje de glucosa aumentó en relación a la disminución de la concentración de ácido sulfúrico a altas temperaturas, sin embargo, a altas concentraciones el efecto de la temperatura sobre la glucosa es indiferente (figura 4).

La variable lineal y cuadrática de concentración fue significativa a una $P < 0.10$ mostrada en el cuadro 14, demostrando un efecto de aumento de glucosa a medida que disminuye la concentración de ácido sulfúrico. La variable lineal de temperatura fue significativa a una $P < 0.10$, determinando que a medida que se aumentó la temperatura, aumentó el porcentaje de glucosa. La interacción entre ambas variables fue significativa a una $P < 0.10$, lo cual indica que la variación en el valor de una de las dos variables afecta en los valores de la otra. El coeficiente de determinación R^2 , está bajo de 0.60, demostrando que 32% de los datos se ajustaron al modelo y 68% no fueron explicados mediante este análisis. La falta de ajuste fue significativa con un $P < 0.10$ y el F calculado fue mayor al F tabular, por lo tanto, el modelo presentó un comportamiento tendencioso.

Cuadro 14. Coeficientes de regresión, probabilidad, valores F y R² para porcentaje de glucosa, en función de la temperatura y concentración de H₂SO₄, durante el pretratamiento de material lignocelulósico.

Factor	Glucosa	p
Intercepto	5.93E-01	1.54E-03•
X ₁	1.74E-01	6.69E-03•
X ₁ ²	1.90E-02	3.81E-01
X ₂	-2.46E-01	3.35E-03•
X ₂ ²	2.41E-01	4.92E-03•
X ₁ *X ₂	-8.00E-02	5.83E-02•
Falta de ajuste		2.07E-03•
R ²		0.31694
F calculado > F tabular		278.93 > 5.27

X₁: Temperatura (°C), X₂: Concentración de H₂SO₄, •: Significativo para una P<0.10

La siguiente ecuación matemática representa el porcentaje de glucosa, basado en los resultados significativos del cuadro 14.

$$\text{Glucosa} = 0.59 + 0.17X_1 - 0.25X_2 + 0.24 X_2^2 - 0.08X_1*X_2 \quad [19]$$

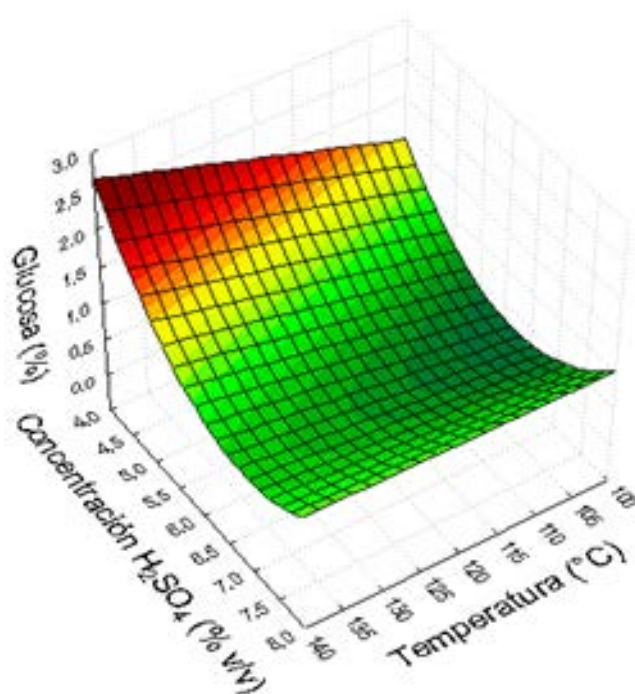


Figura 4. Efecto de concentración y temperatura sobre el porcentaje de glucosa obtenido del hidrolizado de rastrojo de maíz.

El gráfico de superficie respuesta de la figura 4 para glucosa, se hizo a partir de la ecuación 19 y muestra una relación inversamente proporcional, a medida que disminuye la concentración de ácido sulfúrico (H_2SO_4) aumenta el porcentaje de Glucosa. La temperatura es una variable importante en la obtención del azúcar. Incremento en ésta eleva el porcentaje de glucosa. Obteniendo valores de 0.5 a 2.7 %. En el estudio cinético de sacarificación de rastrojo de maíz usando ácido sulfúrico se observa la tendencia, al disminuir temperatura y aumentar concentración de ácido produce alto porcentaje de glucosa, los resultados reportados concuerdan con (Bhandari *et al.* 1983), quienes reportan que una disminución de temperatura (220 a 197 °C) y aumento en concentración (0.92 a 1.47% v/v), provoca descenso en glucosa de 0.24 a 0.14%. Estos valores son bajos en relación a los obtenidos por perfil de azúcares en este estudio (2.5 a 0.5%). La razón del evento observado puede atribuirse que la máxima producción de glucosa se da a 150 °C por 2 horas después empieza a descender, ya que su tasa de degradación en compuestos inhibitorios aumenta (Ixcotoyac 2013). Church y Wooldridge (1981) obtuvieron menor porcentaje en glucosa a una concentración de 4% de H_2SO_4 , esto se asemeja con los resultados obtenidos, además, aplicando una temperatura de 193 °C e incrementando la concentración de ácido de 1 a 1.5%, se obtuvo el máximo valor de porcentaje en azúcar luego descendió gradualmente resultando en un bajo porcentaje de glucosa a 2% de ácido, esto se atribuye a altas temperaturas y tiempos cortos empleados en los pretratamientos.

Galactosa. El porcentaje de galactosa aumenta a medida que disminuye la temperatura y concentración de ácido sulfúrico (figura 5).

La variable lineal y cuadrática de concentración fue significativa a una $P < 0.10$ (cuadro 15), demostrando un efecto de aumento en el porcentaje de galactosa a medida que aumenta la concentración de ácido sulfúrico. La variable lineal y cuadrática de temperatura fue significativa a una $P < 0.10$, determinado que a medida que aumentó la temperatura el porcentaje de galactosa aumentó. La interacción entre ambas variables fue significativa a una $P < 0.10$, lo cual indica que la variación en el valor de una de las dos variables independientes afecta en los valores de la otra. El coeficiente de determinación R^2 está bajo de 0.60, demostrando que 16% de los datos se ajustaron al modelo y 84% no fueron explicados mediante este modelo. La falta de ajuste fue significativa con un $P < 0.10$ y el F calculado fue mayor al F tabular, por lo tanto, el modelo presentó un comportamiento tendencioso.

Cuadro 15. Coeficientes de regresión, probabilidad, valores F y R^2 para porcentaje de galactosa, en función de la temperatura y concentración de H_2SO_4 , durante el pretratamiento de material lignocelulósico.

Factor	Galactosa	p
Intercepto	1.58E+01	1.04E-04•
X_1	5.80E-01	2.78E-02•
X_1^2	7.03E-01	2.68E-02•
X_2	1.05E+00	8.69E-03•
X_2^2	5.38E-01	4.45E-02•
$X_1 * X_2$	-7.85E-01	3.02E-02•
Falta de ajuste		2.56E-03•
R^2		0.16045
F calculado > F tabular		175.92 > 9.37

X_1 : Temperatura ($^{\circ}C$), X_2 : Concentración de H_2SO_4 , •: Significativo para una $P < 0.10$

La siguiente ecuación matemática representa el porcentaje de galactosa, basado en los resultados significativos del cuadro 15.

$$\text{Galactosa} = 15.82 + 0.58X_1 - 0.70X_1^2 + 1.05X_2 + 0.54X_2^2 - 0.79X_1 * X_2 \quad [20]$$

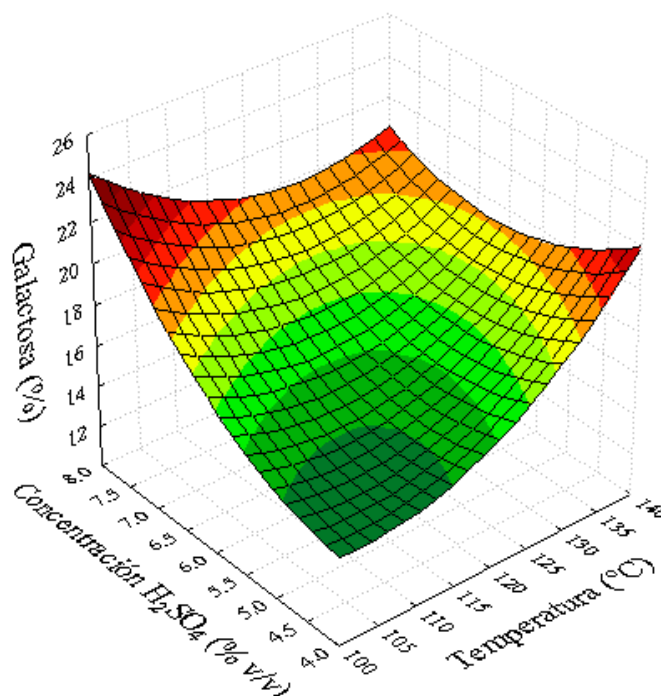


Figura 5. Efecto de concentración de ácido y temperatura en el porcentaje de galactosa obtenido del hidrolizado de rastrojo de maíz.

El gráfico de superficie respuesta de la figura 5 para porcentaje de galactosa, se hizo tomando en cuenta la ecuación 20, se observa que el incremento en la concentración de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y la disminución de temperatura, aumentan el porcentaje de galactosa, alcanzando un valor de 24%. Además, muestra que con baja concentración de ácido y alta temperatura se obtiene un porcentaje de azúcar considerable de 22%. Este comportamiento concuerda con el estudio realizado por Ixcotoyac (2013) y muestra que el aumento de concentración (5 y 10% H_2SO_4) y temperatura (120 y 150 °C) en cada tratamiento genera mayor cantidad de galactosa (7.72 – 11.32 g /100g M.S.).

Sin embargo, estos valores no concuerdan con los obtenidos en este estudio, pues se trabaja con diferente tipo de material lignocelulósico. Las coníferas presentan ramificaciones de galactosa en su estructura lo que justifica su presencia, además la diferencia se atribuye al porcentaje del polímero hemicelulosa identificado en el rastrojo de maíz con un valor de 19.7% a comparación de 15.2% en *Pinus spp*, esto se traduce en mayor cantidad de galactosa después del pretratamiento bajo condiciones similares en pretratamiento para rastrojo de maíz; además se considera que el extracto de los tallos de maíz está formado en su mayoría por: glucosa, sacarosa y fructosa (Moreno 2014). Esto se debe a que el maíz es una planta angiosperma la cual presenta galactosa como monosacárido principal (Barroso 2010). La hemicelulosa está formada por monómeros unidos por enlaces β 1-4 (principalmente xilosa, arabinosa, galactosa, manosa glucosa), que forman una cadena lineal ramificada destacándose en su mayoría por la presencia de azúcares simples como glucosa xilosa, galactosa y fructosa (Cortínez 2010).

Fructosa. El porcentaje de fructosa aumenta a medida que disminuye la concentración de ácido sulfúrico, además el aumento en temperatura promueve el aumento del porcentaje de fructosa (figura 6).

La variable lineal y cuadrática de concentración fue significativa a una $P < 0.10$ (cuadro 16), demostrando una relación inversamente proporcional, ya que a medida que disminuyó la concentración de ácido sulfúrico, aumentó el porcentaje de fructosa. La variable cuadrática de temperatura fue significativa a una $P < 0.10$, determinando que a medida que se aumenta la temperatura el porcentaje de fructosa aumenta pero en mínima proporción en comparación a la influencia de la concentración del ácido sobre los valores de esta variable dependiente. La interacción entre ambas variables fue significativa a una $P < 0.10$, lo cual indica que la variación en el valor de una de las dos variables afecta en los valores de la otra. El coeficiente de determinación R^2 está sobre 0.60, demostrando que 79% de los datos se ajustaron al modelo y 21% no fueron explicados mediante este análisis. La falta de ajuste fue significativa con un $P < 0.10$ y el F calculado fue mayor al F tabular, por lo tanto, el modelo presentó un comportamiento tendencioso.

Cuadro 16. Coeficientes de regresión, probabilidad, valores F y R^2 para porcentaje de fructosa, en función de la temperatura y concentración de H_2SO_4 , durante el pretratamiento de material lignocelulósico.

Factor	Fructosa	p
Intercepto	1.10E+00	1.07E-03•
X_1	5.92E-02	1.15E-01
X_1^2	4.56E-01	3.31E-03•
X_2	-2.46E-01	7.93E-03•
X_2^2	3.63E-01	5.20E-03•
$X_1 \cdot X_2$	3.65E-01	7.24E-03•
Falta de ajuste		1.69E-02•
R^2		0.78664
F calculado > F tabular		43.22 > 5.27

X_1 : Temperatura ($^{\circ}C$), X_2 : Concentración de H_2SO_4 , •: Significativo para una $P < 0.10$

La siguiente ecuación matemática representa el porcentaje de fructosa, basado en los resultados significativos del cuadro 16.

$$\text{Fructosa} = 1.10 + 0.46X_1^2 - 0.25X_2 + 0.36X_2^2 + 0.37X_1 \cdot X_2 \quad [21]$$

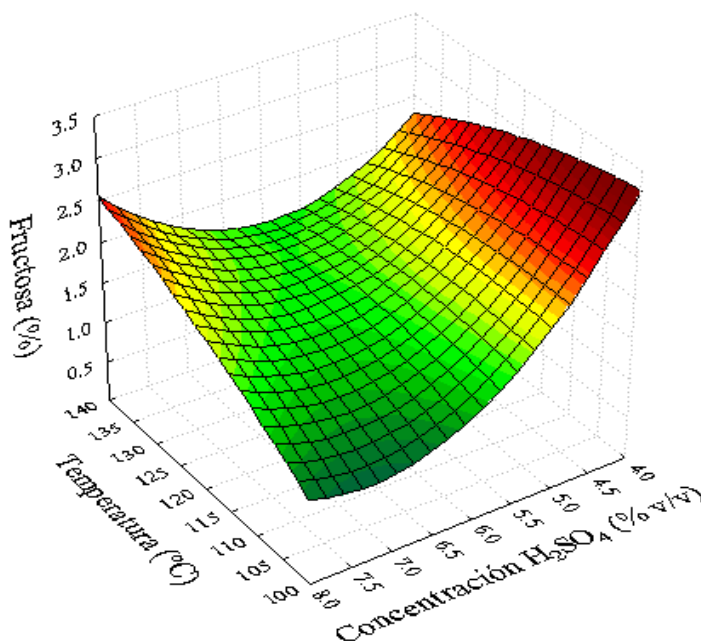


Figura 6. Efecto de la temperatura y concentración de ácido sobre el porcentaje de fructosa obtenido del hidrolizado de rastrojo de maíz.

El gráfico de superficie respuesta de la figura 6 para fructosa se desarrolló tomando en cuenta la ecuación 21. La fructosa es una hexosa que se localiza en la hemicelulosa de los tallos de plantas su cantidad varía de acuerdo a la variedad y edad fisiológica del cultivo, además la pared celular de las plantas está formada por lignocelulosa, su composición y porcentajes de polímeros varía entre especies de plantas, incluso edad fisiológica y etapa de crecimiento (Jeffries 1994). De acuerdo a estudios se ha identificado que el tallo de la caña presenta 2% de fructosa en su composición, dato que concuerda con este estudio y se reporta valores desde 1 hasta 3% de fructosa cuando la temperatura aumenta o la concentración disminuye. En el estudio del rendimiento de cultivo de caña de azúcar se obtiene azúcares fermentables como: 44% sacarosa, 3% Glucosa, 2% fructosa y 2% de almidón (Gracia 2009). Montoya y Quintero (2005), reportan en su estudio 0.6% de fructosa en caña de azúcar, tales resultados se atribuyen a que no hay aplicación de un pretratamiento con ácido diluido cuyo principio se basa en la solubilización de la hemicelulosa en monómeros de carbohidratos más fáciles de fermentar (Cortínez 2010).

Las hexosas como fructosa se degradan en hidroximetilfurfural (HMF) a temperaturas altas (180 °C). Una mayor cantidad de HMF presenta menor pH y mayor concentración de ácido sulfúrico en el hidrolizado, por consiguiente a menor concentración de ácido existirá mayor cantidad de fructosa y menor hidroximetilfurfural (Fachri *et al.* 2015). La relación de temperatura y fructosa puede sufrir transformaciones al igual que la glucosa, debido a reacciones dependientes que existe con ella (Fajardo y Sarmiento 2007). Castro (1993) en el estudio de melaza de caña como sustrato de fermentación acetobutílica, indica que el contenido de glucosa y fructosa puede variar por causa de la hidrólisis de la sacarosa a valores de pH ácido y temperaturas altas.

De acuerdo a estudios aplicando hidrólisis ácida y caracterización de carbohidratos de pulpa de café se obtiene que un incremento en la concentración de ácido sulfúrico (0.5 – 2% p/v) disminuye el porcentaje de fructosa (1.98 – 1.65), resultados que concuerdan con este estudio (3- 1% de Fructosa) (Urbaneja *et al.* 1997). En el estudio de Hidrólisis ácida de sustratos residuales agroindustriales en Colombia, se concluye de que a medida que aumenta la temperatura, aumenta el porcentaje de fructosa y reporta que a 4% v/v de ácido sulfúrico y a temperatura de 100 °C, se obtiene 16.28% de azúcares reductores expresados en glucosa y fructosa (Fonseca y Oviedo 2006).

Azúcares totales. El porcentaje de azúcares totales aumentó a medida que incrementó la concentración de ácido sulfúrico y la temperatura (figura 7).

Las variables lineal y cuadrática de concentración fueron significativas a una $P < 0.10$ (cuadro 17), demostrando que a medida que aumentó la concentración de ácido sulfúrico aumentó el porcentaje de azúcares totales identificados en el estudio. Las variables lineal y cuadrática de temperatura fueron significativas a una $P < 0.10$, determinado que a medida que aumentó la temperatura el porcentaje de azúcares totales aumentaron. La interacción entre ambas variables no fue significativa con una $P > 0.10$. El coeficiente de determinación R^2 está bajo de 0.60, demostrando que 15% de los datos se ajustaron al modelo y 85% no fueron explicados mediante este análisis. La falta de ajuste fue significativa con un $P < 0.10$

y el F calculado fue mayor al F tabular, por lo tanto, el modelo presentó un comportamiento tendencioso.

Cuadro 17. Coeficientes de regresión, probabilidad, valores F y R^2 para porcentaje de azúcares totales, en función de la temperatura y concentración de H_2SO_4 , durante el pretratamiento de material lignocelulósico.

Factor	Azúcares Totales	p
Intercepto	1.75E+01	1.33E-04●
X_1	8.12E-01	2.24E-02●
X_1^2	1.18E+00	1.52E-02●
X_2	5.57E-01	4.59E-02●
X_2^2	1.14E+00	1.62E-02●
$X_1 * X_2$	-4.93E-01	1.06E-01
Falta de ajuste		3.19E-03●
R^2		0.15124
F calculado > F tabular		48.50 > 5.27

X_1 : Temperatura ($^{\circ}C$), X_2 : Concentración de H_2SO_4 , ●: Significativo para una $P < 0.10$

La siguiente ecuación matemática representa el porcentaje de azúcares totales, basado en los resultados significativos del cuadro 17.

$$\text{Azúcares totales} = 17.52 + 0.81X_1 + 1.18X_1^2 + 0.56X_2 + 1.14 X_2^2 \quad [22]$$

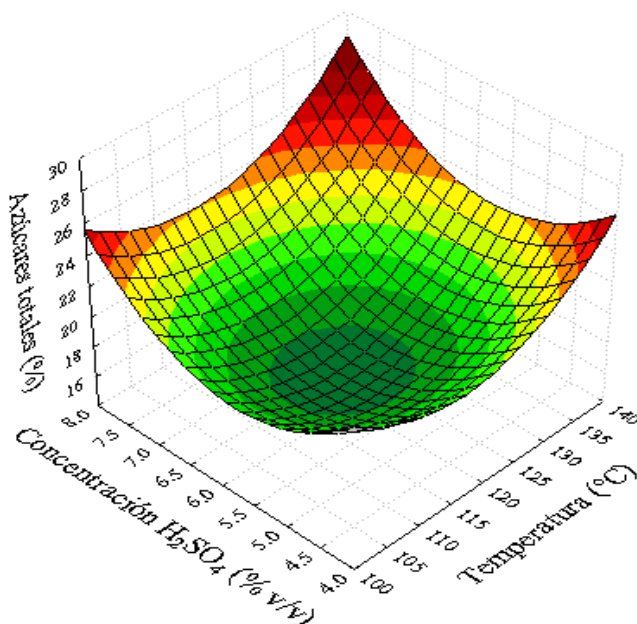


Figura 7. Efecto de concentración de ácido y temperatura sobre el porcentaje de azúcares totales obtenido del hidrolizado de rastrojo de maíz.

El gráfico de superficie respuesta de la figura 7 para azúcares totales, se hizo basado en la ecuación 22. Se observa que a medida que aumentó la concentración de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y temperatura, aumentó el valor de azúcares totales, alcanzando valores entre 18 a 28%. Esta tendencia concuerda con los estudios realizados por Mazariegos (2013) e Ixcotoyac (2013) quienes evaluaron el efecto de temperatura y concentración de H_2SO_4 en producción de azúcares con bagazo de caña y aserrín de *Pinus spp.* respectivamente y concluyeron que mayor concentración de ácido y temperatura se genera mayor porcentaje de azúcares totales, usando concentraciones de (6-12% H_2SO_4 ; 120 y 150 °C) y (5-10% H_2SO_4 ; 120 y 150 °C), obtiene valores de 41.1 y 21.67%. Los valores en azúcares totales no coinciden con lo reportado por este estudio debido al material lignocelulósico empleado y a la concentración aplicada en el pretratamiento, sin embargo se obtiene un porcentaje de 70% en contraste con la cantidad de azúcares totales obtenidos con bagazo caña. En los azúcares totales con aserrín de *Pinus spp.* al aplicar concentración de 10% de ácido sulfúrico y 150 °C se obtiene 21.67% de azúcares totales. Estos resultados concuerdan con este estudio, debido a que en bagazo de caña el porcentaje de azúcares reductores será mayor que en rastrojo de maíz y pino por la composición estructural del material (Jefries 1994). Chandler *et al.* (2012) en su estudio usando bagazo de caña determina que existe una relación directamente proporcional entre temperatura y obtención de azúcares reductores al aplicar temperaturas entre 100-160 °C se obtiene 1.51 a 11.05% de azúcares reductores. Además de acuerdo a un estudio enfocado en la obtención de azúcares fermentables a partir de bagazo de caña de azúcar mediante hidrólisis ácida diluida en dos etapas menciona que la mayor producción de azúcares reductores se da a temperaturas de 100 a 140 °C, sin embargo a mayor temperatura el comportamiento se invierte (Villalobos 2012).

Función de Utilidad. Al evaluarse más de una variable dependiente, surge el interés por identificar los valores óptimos de las variables independientes para ser aplicados durante la operación lo cual garantice la optimización de las respuestas dentro de un rango deseable, cumpliendo así las especificaciones para las variables dependientes (Calado y Montgomery 2003).

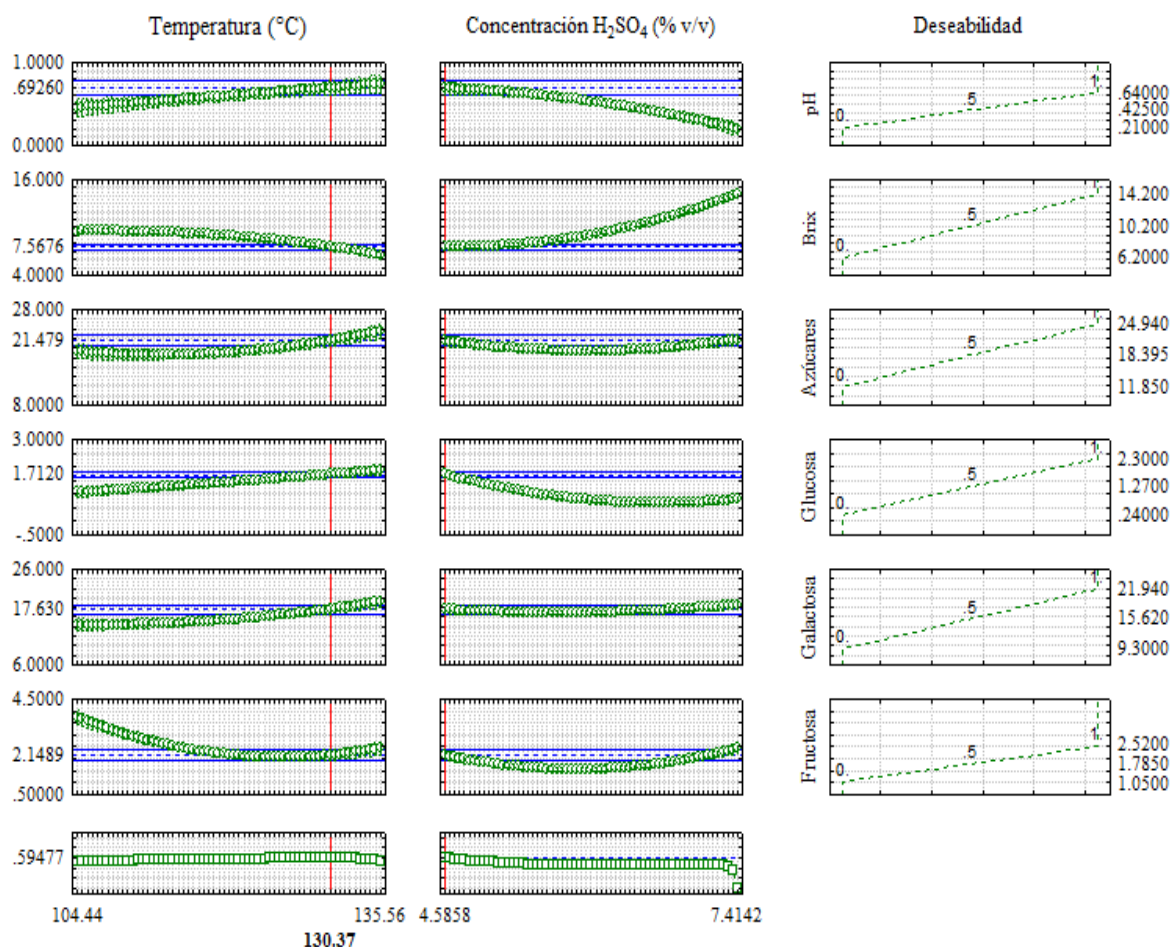


Figura 8. Función de utilidad para la optimización del pretratamiento con ácido diluido para rastrojos de maíz.

Para determinar la función de utilidad, se utilizó un procedimiento de optimización con restricción. Se consideró valores de 1 para las respuestas deseadas y 0 para las no deseadas, como se muestra en la figura 8, seleccionado a través de la función de utilidad las variables dependientes maximizando así los resultados deseados en el estudio. Para dicha función de utilidad se consideraron las siguientes variables dependientes: pH, °Brix, % de Azúcares totales, Glucosa, Galactosa y Fructosa, ya que se han considerado como las de mayor importancia al someter a un pretratamiento al material lignocelulósico destinado para la obtención de bioetanol.

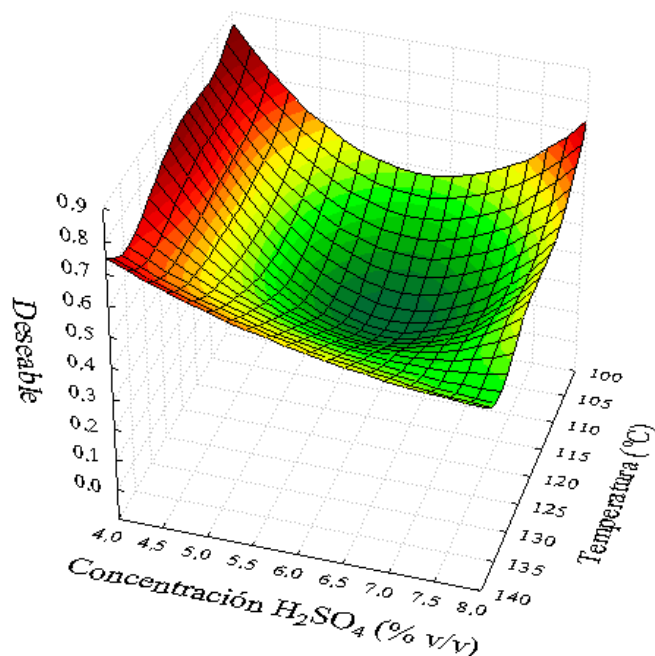


Figura 9. Efecto de la concentración y temperatura sobre los resultados deseables en el hidrolizado obtenido a partir del pretratamiento de rastrojos de maíz con ácido sulfúrico diluido.

La figura 9 muestra la optimización de las variables independientes dentro del rango propuesto; temperatura: 104-136 °C y concentración de ácido sulfúrico: 4.6 – 7% v/v.

Cuadro 18. Composición química del hidrolizado obtenido en condiciones óptimas.

Muestra	pH ± D.E.	°Brix ± D.E.	Glucosa (%) ± D.E.	Galactosa (%) ± D.E.	Fructosa (%) ± D.E.	Azúcares T. (%) ± D.E.
130°C y 4.58% v/v H ₂ SO ₄	0.66± 0.03	9.27± 0.10	0.33± 0.04	17.17± 0.31	7.08± 5.18	24.57± 5.02

D.E.: Desviación estándar.

Fuente: Cevallos y Chariguaman 2016, adaptado por los autores.

4. CONCLUSIONES

- La concentración y temperatura tienen efecto sobre pH, grados brix y azúcares totales de un hidrolizado de rastrojo de maíz.
- Se determinó que el mayor porcentaje para azúcares totales se obtuvo aplicando 131 °C y 7% v/v de ácido sulfúrico (H_2SO_4).
- De acuerdo a la función de utilidad obtenida para generar las respuestas deseadas en las variables dependientes estudiadas del hidrolizado, se debe someter al material lignocelulósico a una temperatura de 130 °C y 4.58% v/v de ácido sulfúrico (H_2SO_4).
- El tratamiento de la función de utilidad generó valores en pH de 0.66, Brix de 9.27, 0.33% de glucosa, 17.17% de galactosa, 7.08% de fructosa y 24.57% de azúcares totales.
- Todos los modelos matemáticos presentan un comportamiento tendencioso.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos con hidrólisis enzimática para promover la degradación de la celulosa presente en el rastrojo de maíz.
- Evaluar el porcentaje de digestibilidad de los componentes lignocelulósicos después del pretratamiento para conocer con exactitud si hubo solubilización de hemicelulosa y reducción de cristalinidad de la celulosa.
- Evaluar la presencia de hidroximetilfurfural (HMF) y producir bioetanol a partir del hidrolizado obtenido con el tratamiento óptimo.
- Usar un solo equipo en la medición de los grados Brix.
- Analizar costos de producción y factibilidad económica.

6. LITERATURA CITADA

Aguilar D. 2011. Producción de etanol a partir de bagazo de caña panelera mediante un sistema híbrido de fermentación y pervaporación [Tesis]. Universidad Nacional de Colombia- Manizales. 76 p.

Aguilar N. 2010. Modelo Cinético de la hidrólisis del residuo de cosecha cañero. Redalyc. 20(2): 5-18 p.

Alonso J. 2009. Estudio del efecto de tipo, concentración de ácido y tiempo de digestión en hidrólisis de forraje de camote (*Ipomea batatas*) [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano- San Antonio de Oriente. 19 p.

Amor A, Cruz O, Guerra F. 2008. Producción de bioetanol: pretratamiento del mías [Tesis]. Universidad Iberoamericana- México D.F. 45 p.

Ban J., Yu J., Zhang X., Tan T. 2008. Ethanol production from sweet sorghum residual. Higher Education Press and Springer: 2(4): 452-455. eng. doi: 10.1007/s1505-008-0072-6.

Barroso M. 2010. Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorefinería [Tesis]. Universidad Politécnica de Madrid- Madrid. 151 p.

Bernier D, Rincon J. 2012. Estudio de agentes inhibitorios en el proceso de fermentación en la obtención de etanol a partir de material lignocelulósico y amiláceo [Tesis]. Universidad del Tolima- Ibagué. 46 p.

Bhandari N, Macdonald D, Bakhshi N. 1983. Estudios cinéticos de sacarificación de rastrojo de maíz usando ácido sulfúrico. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Saskatchewan- Canadá. 321- 327 p.

Calado V, Montgomery D. 2003. Planejamento de Experimentos usando o Statistica. Livia Krykhtine. Rio de Janeiro, Brasil. E-papers servicos editoriais. 260 p.

Cara C, Ruíz E, Oliva J, Sáez F. Castro E. 2008. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification [Tesis]. University of Jaén- Jaén, España. 76 p.

Castillo C. 2014. Obtención de un hidrolizado detoxificado a partir de biomasa lignocelulósica de *Panicum máximum* para su uso como sustrato en la fermentación alcohólica [Tesis]. Universidad Nacional de Colombia- Bogotá. 158p.

Castro M. 1993. Estudio de la melaza de caña como sustrato de la fermentación acetobutílica [Tesis]. Universidad Nacional de Colombia- Bogotá. 35 p.

Cavieres P. 2008. Biocombustibles de primera generación [internet]. Chile: EMB; [accessed 2016 August 15]. <http://www.emb.cl/electroindustria/articulo.mvc?xid=959>

Cevallos N. 2015. Efecto de la adición de semillas de chía (*Salvia hispanica L.*) en las características físicas, químicas y sensoriales del yogur natural [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano- San Antonio de Oriente. 42 p.

Contreras J. 2011. Plan de Calibración y validación interna perfil de azúcares por HPLC método AOAC 982.14. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano- San Antonio de Oriente. 13 p.

Cortínez V. 2010. Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: hidrólisis ácida y líquidos iónicos [Tesis]. Universidad de Chile- Santiago de Chile. 122 p.

Chandler C, Villalobos N, González E, Arenas E, Mármol Z, Ríos J, Aiello C. 2012. Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares fermentables. Redalyc. [accessed 2016 August 10]. 12 (3): 245 – 253. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90426810002>

Chariguamán J. 2015. Caracterización de bioplástico de almidón elaborado por el método de casting reforzado con albedo de maracuyá (*Passiflora edulis* spp.) [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano- San Antonio de Oriente. 60 p.

Church J, Wooldridge D. 1981. Continous high-solids acid hydrolysis of biomass in a 1 $\frac{1}{2}$. plug flow reactor. ACS. 20(2). 371- 378. eng. doi: 10.1021/i300002a027.

Dagnino E, Chamorro E, Romano S, Felissia F, Area M. 2012. Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. Elsevier. [accessed 2016 June 13]. 42: 363 – 368. eng. <http://www.frre.utn.edu.ar/quimobi/clean/files/get/item/2281>

Díaz N, Bárcena J, Fernández E, Galván A, Jorrín J, Peinado J, Meléndez J, Túnez I. 2006. Espectrofotometría: espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas [Internet]. Córdoba- España. [accessed 2016 August 28]. http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol%20mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETR%C3%8DA.pdf.

El Hage R, Chrusciel L, Desharnais L, Brosse N. 2010. Effect of autohydrolysis of *Miscanthus x giganteus* on lignin structure and organosolv deslignification. Elsevier. [accessed 2016 June 13]. 101(23): 9321 - 9329. eng. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.143>

Fachri B, Abdilla R, Bovenkamp H, Rasrendra C, Heeres H. 2015. Experimental and kinetic modeling studies on the sulphuric acid catalyzed conversion of D-Fructose to 5-Hydroxymethylfurfural and Levulinic acid in water. ACS. 3(12):1-30.

Fajardo E, Sarmiento S. 2007. Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae* [Tesis]. Pontificia Universidad Javeriana- Bogotá D.C., Colombia. 120 p.

Fonseca E, Oviedo A, Vargas I. 2006. Hidrólisis ácida de sustratos residuales agroindustriales colombianos. Redalyc. [accessed 2016 June 02]. (8): 5-11. <http://www.redalyc.org/pdf/304/30400802.pdf>

Gracia C. 2009. Bioetanol. In: Rojals . Biocombustibles: ¿Energía o Alimento?. 77-103 p.

Guo G, Chen W, Chen W. Men L, Hwang W. Characterization of dilute acid Pretreatment of silvergrass for ethanol production. Cellulosic ethanol project, Institute of nuclear Energy Research. Taiwan: Elsevier. 2007-2008.

Holgado F., Hernández M., Torres J., Fernández J. 2010. Composición morfológica y química de los componentes de la planta de maíz [internet]. Tucumán. [accessed 2016 Aug 17]. http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_holgado_composicion_morfologica.pdf

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 2007. Atlas de la Agro energía y los biocombustibles en las américas. IICA. 6-181p.

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 2007. Preguntas y respuestas más frecuentes sobre Biocombustibles. IICA. 1 – 23 p.

Ixcotoyac E. 2013. Efecto de la temperatura y concentración de ácido sulfúrico de pretratamiento de aserrín de *Pinus spp.* en la producción de azúcares y 5-hidroximetilfurfural [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano- San Antonio de Oriente. 26 p.

Jacques K, Lyons T, Kelsall D. 2003. The Alcohol Textbook. 4th Edition [internet]. United Kingdom: [accessed 2016 Sep 12]. <https://es.scribd.com/doc/16683522/Alcohol-Textbook-4th-Ed>

Jeffries TW. 1994. Biodegradation of lignin and hemicelluloses. In: Biochemistry of microbial degradation. In: Ratledge C (ed.). Kluwer, Dordrecht. 233–277.

Kuster F, Temmink, H. The influence of pH and weakacid anions on the dehydration of Dfructose. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam. Carbohydrate Research, vol. 54. 185–191. 1976-2000

Lopatinsky M. 2008. Obtención de Bio-combustible orgánico a partir de *Zea mays* con aplicación de alfa amilasa [Tesis]. Escuela Superior Politécnica del Litoral- Guayaquil. 58 p.

Mazariegos C. 2013. Efecto de la temperatura y la concentración de H_2SO_4 en la producción de azúcares y 5-hidroximetilfurfural en el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano- San Antonio de Oriente. 30 p.

Molina G, Rodrigo M. 2010. Estadísticos de asociación entre variables [Internet]. Valencia – España. [accessed 2016 Sept 05]. http://ocw.uv.es/ciencias-de-la-salud/pruebas-1/1-3/t_08-1.pdf

Montoya M, Quintero J. 2005. Esquema Tecnológico integral de la producción de bioetanol carburante [Tesis]. Universidad Nacional de Colombia- Manizales. 144 p.

Moreno O. 2014. Dinámica de Carbohidratos no-estructurales en tallo de mestizos de maíz y sus características agronómicas [Tesis]. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro- Coahuila, México. 64 p.

Núñez M. 2011. Efecto de la temperatura y la concentración de H_2SO_4 (Ácido sulfúrico), en el pre tratamiento de digestión de aserrín de pino (*Pinus oocarpa*) para la producción de etanol lignocelulósico [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano- San Antonio de Oriente. 23 p.

Pampulha M.E., Loureiro-Diaz M.C. 1989. Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 34:375-380.

Pulido F, Rosas R, Téllez T. 2013. Obtención de azúcares fermentables mediante hidrólisis ácida y explosión por vapor de residuos agroindustriales [Tesis]. Instituto Superior Tecnológico Tierra Blanca- Veracruz. 38 p.

Reyes H, Rosero B, Cardona L. 2014. Determinación de la eficiencia del proceso de fermentación realizado por levaduras *Candida kefyri* *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de xilitol. *Revista de investigaciones- Universidad del Quindío*. [accessed 2016 Sept 03]. 26(1): 34- 42. <http://www.riug.edu.co/index.php/riug/article/viewFile/6/9>

Rodrigues M, Lemma A. 2012. Diseño experimental y optimización de procesos. Campinas, SP (Brazil): Cárita editora. 357 p.

Romero X, Navarro P, Noguera J. 2005. Acidez y Ph [Internet]. Edición 2005. Universidad de los Andes- Mérida, Venezuela: La Hechicera. [accessed 2016 July 07]. http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/16739/1/acidez_ph.pdf

Sánchez J, Calderón Z, García M. 2013. Química II. Primera edición. Buenos Aires. Editorial Asimov. [accessed 2016 June 08]. http://prepaunivas.edu.mx/v1/images/pdf/libros/quimica_II.pdf

Saval S. 2012. Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. BioTecnología. [accessed 2016 July 20]. 16(2): 14 - 46. http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2012_2/Saval_Residuosagroindustriales.pdf

Subovsky M, Sosa A, Castillo A, Cano N. 2012. Evaluación del contenido de hidroximetilfurfural en mieles del NEA [internet]. Corrientes- Argentina. [accessed 2016 Sept 01]. <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2002/05-Agrarias/A-031.pdf>

Tames R, Rubio J, Nava A. 2015. Microbiología Aplicada [internet]. México. [accessed 2015 July 26]. <http://documents.mx/documents/microbiologia-aplicada-55b51614d6f5a.html>

Treviño J, Hernández T, Caballero R. 2011. Estudio del valor nutritivo de las hojas y tallo del maíz híbrido de tallo azucarado E-10 [Tesis]. Instituto de Alimentación y Productividad Animal (C.S.I.C.)- Madrid. 288-289.

Universidad de Alcalá. Facultad de Farmacia. sf. Equilibrio ácido- Base [internet]. Alcalá, España. [accessed 2016 July 18]. http://www3.uah.es/edejesus/resumenes/QG/Tema_13.pdf

Urbaneja G, Ferrer J, Páez G, Arenas L, Colina G, Sandoval L. 1997. Hidrólisis ácida y caracterización de carbohidratos de la pulpa de café. Revista de la Facultad de Agronomía. [accessed 2016 June 17]. 14(2): 265- 275. <http://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/11680/11670>

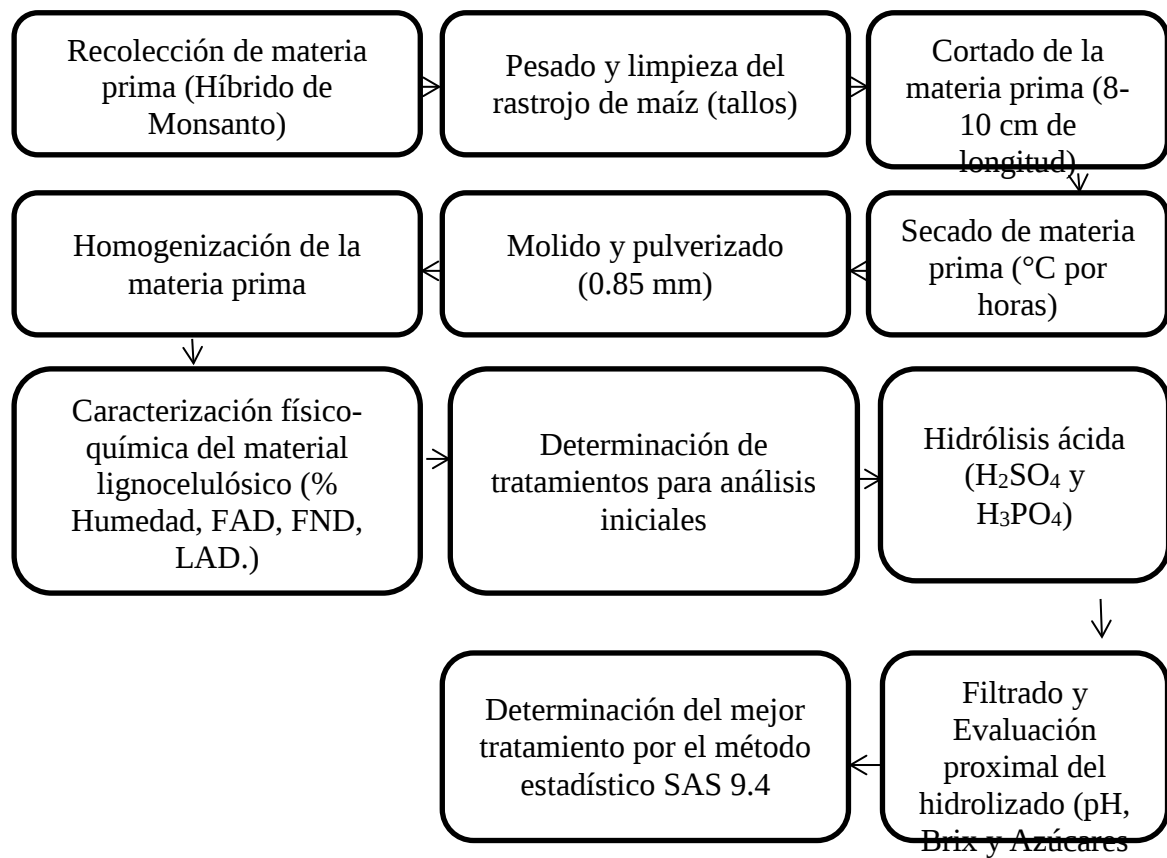
Villalobos N. 2012. Obtención de azúcares fermentables a partir del bagazo de la caña de azúcar mediante la hidrólisis ácida diluida en dos etapas [Tesis]. Universidad de Zulia, Facultad de Ingeniería química- Maracaibo. 84 p.

Viñals-Valverde M, Bell-García A, Michelena-Álvarez G, Ramil-Mesa M. 2012. Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Redalyc. [accessed 2016 June 12]. 46(1): 7-16. <http://www.redalyc.org/pdf/2231/223123848002.pdf>

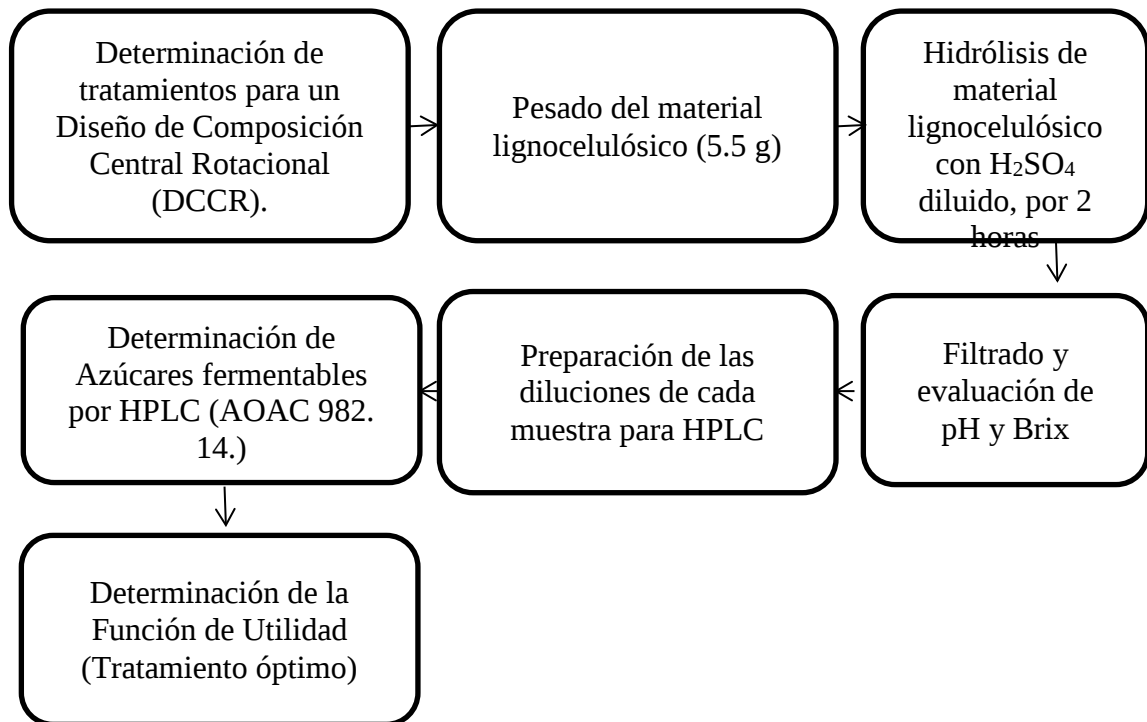
7. ANEXOS

Anexo 1. Flujo de proceso.

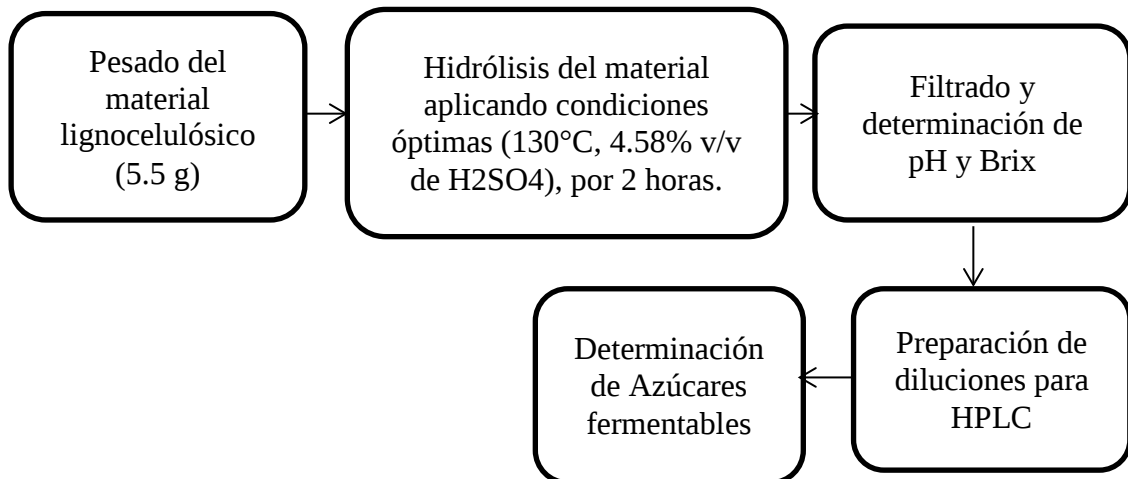
FASE I:



FASE II:



FASE III:



Anexo 2. Resultados de análisis químicos del rastrojo de maíz.

Tratamiento	X1		X2		pH±σ	Brix±σ	Glucosa±σ	Galactosa±σ	Fructosa±σ	Azúcares totales±σ
1	-1	109	-1	5.0	0.58 ± 0.005 b	8.01 ± 0.05 f	0.24 ± 0.005 e	9.30 ± 0.033 f	2.30 ± 0.006 ab	11.85 ± 0.032 d
2	-1	109	1	7.0	0.45 ± 0.005 e	11.40 ± 0.1 c	0.56 ± 0.044 cd	17.64± 0.103 cd	1.15 ± 0.080 d	19.34 ± 0.067 b
3	1	131	-1	5.0	0.61 ± 0.005 a	8.85 ± 0.05 e	0.48 ± 0.012 d	16.74± 0.327 de	2.21 ± 0.027 b	19.42 ± 0.342 b
4	1	131	1	7.0	0.21 ± 0.005 g	14.20 ± 0.1 a	0.48 ± 0.007 d	21.94± 0.114 a	2.52 ± 0.120 a	24.94 ± 0.240 a
5	-1.4	104	0	6.0	0.44 ± 0.005 e	11.0 ± 0.1 d	0.61± 0.004 cd	20.40± 1.078 ab	2.17 ± 0.007 b	23.18 ± 1.075 a
6	1.41	136	0	6.0	0.64 ± 0.005 a	6.25 ± 0.05 g	1.48 ± 0.072 b	15.38± 0.281 e	1.60 ± 0.028 c	18.46 ± 0.381 bc
7	0	120	-1.4	4.6	0.58 ± 0.005 b	9.05 ± 0.05 e	2.30 ± 0.004 a	19.37± 0.300 bc	2.10 ± 0.054 b	23.77 ± 0.250 a
8	0	120	1.41	7.4	0.33 ± 0.005 f	13.35 ± 0.05 b	0.68 ± 0.015 c	15.75± 0.294 de	1.30 ± 0.019 cd	17.72 ± 0.299 bc
9 ©	0	120	0	6.0	0.55 ± 0.005 c	9.70 ± 0.1 d	0.63± 0.006 cd	16.07± 0.104 de	1.08 ± 0.034 d	17.78 ± 0.063 bc
10 ©	0	120	0	6.0	0.52 ± 0.005 d	9.75 ± 0.05 d	0.55± 0.045 cd	15.52± 0.214 e	1.05 ± 0.026 d	17.12 ± 0.285 c
11 ©	0	120	0	6.0	0.50 ± 0.005 d	9.80 ± 0.1 d	0.60 ± 0.035 cd	15.88± 0.069 de	1.17 ± 0.045 d	17.65 ± 0.150 bc
C.V.					1.44	0.99	5.84	3.07	4.4	2.83
R2					0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.98

©: Punto central

C.V.: Coeficiente de variación

D.E.: Desviación estándar