

UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE DIOS
FACULTAD DE INGENIERÍA
CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



INFORME FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“Obtención de etanol a partir del pasto brachiaria (*Brachiaria brizantha* (Hochst. Ex A. Rich.) Stapf) previo pretratamiento con agua líquida caliente (LHW) y posterior hidrolisis ácida y enzimática”

Investigador Responsable:

Ing°. Javier Eduardo Diaz Viteri

Co-investigadores

Ing° Pedro Saúl Montalván Apolaya

Dra. Maria Isabel Cajo Pinche

Ing. Jesus Manel Flores Arizaca

Dra. Roxana Madueño Portilla

M. Sc. Larry Oscar Chañi Paucar

M. Sc. Joel Peña Valdeiglesias

Asesor:

Dr. Oscar Mendieta Taboada

Puerto Maldonado-2017

Tabla de contenido

RESUMEN.....	4
ABSTRACT	5
I. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Objetivo General	6
1.2 Objetivos Específicos	6
II. JUSTIFICACIÓN	7
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	8
4.1 ANTECEDENTES.....	8
4.2 MARCO CONCEPTUAL	9
Pasto Brachiaria.....	9
Clasificación Taxonómica	10
Material lignocelulósico	10
Celulosa	10
Hemicelulosa	11
Lignina.....	11
Composición de lignina y celulosa en brachiaria	12
Importancia del material lignocelulósico.....	12
Fermentación.....	12
Etanol de celulosa o bioetanol.....	13
La fermentación alcohólica	13
Ventajas y desventajas del bioetanol	16
Hidrolisis del material lignocelulósico	16
Tecnologías convencionales para la producción de etanol	17
Hidrolisis	17
Hidrólisis ácida.....	17
Hidrólisis enzimática.....	18
Conversión de la sacarosa a etanol	18
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1 Materiales y equipos.....	19
4.2 Métodos	22
4.3 Análisis Estadístico	24
V. RESULTADOS Y DISCUSION.....	25
5.1 Composición de celulosa y lignina en <i>B. brizantha</i>	25
5.2 Conversión de celulosa en azúcares mediante hidrólisis ácida.....	25
5.3 Hidrolisis enzimática	27
5.4 Obtención de etanol	29
VI. CONCLUSIONES.....	30

VII. RECOMENDACIONES	31
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	32

RESUMEN

El proyecto de investigación tuvo como objetivo obtener etanol a partir del pasto brachiaria (*Brachiaria brizantha* (Hochst. Ex A. Rich.) Stapf), previo pretratamiento con agua líquida caliente (LHW) y posterior hidrolisis acida y enzimática. Para ello se evaluó el efecto de la hidrolisis acida y enzimática sobre la conversión de celulosa de pasto brachiaria y se comparó la eficiencia en la obtención de alcohol en líquido lignocelulósico hidrolizado en dos niveles de concentración de enzima celulasa. Las muestras de pasto fueron sometidas a deshidratación, molienda y acondicionamiento con pretratamiento con agua líquida caliente, para luego ser hidrolizado con ácido sulfúrico al 5% en razón de 1:5 e hidrolisis enzimática en razón del 5% y 8% por 14 horas. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a fermentación con adición al jugo celulósico con levadura *Sacharomyes cerevisiae* en razón del 0,5% en condiciones anaerobias. Después de la fermentación, las muestras fueron sometidas a destilación a 100°C. Los resultados muestran que el proceso de hidrolisis acida con ácido sulfúrico logro una conversión de material lignocelulósico en solidos solubles de 21,8 °Brix en 16 horas; en la hidrolisis enzimática al 5% y 8% de concentración de enzimas sometida a una temperatura de 50°C, se alcanzó 25,2 y 28,2 °Brix, respectivamente. En la conversión de celulosa en azúcares expresados en Solidos Solubles (°Brix), muestra el ajuste de estos datos a un modelo cinético establecido por Michaelis establece valores de los parámetros de V_{max} , n y K , de $20,87376 \pm 0,4984$, $2,6522 \pm 0,17242$ y $7,0622 \pm 1,47156$ respectivamente, con un coeficiente de determinación al modelo ajustado de 0.98885, lo que nos indica que para un nivel de confiabilidad del 95 % el modelo ajusta muy bien a los datos experimentales. En el proceso de conversión de líquido celulósico a etanol se tuvo rendimientos de 40,98% para el líquido celulósico hidrolizado con enzima al 5% y 42,98% para el líquido hidrolizado el 8%. Presentaron coeficientes de variabilidad de presentó un bajo valor de desviación estándar de 0,20 y un menor coeficiente de variabilidad de 1,65%, respecto al tratamiento con concentración de enzima de 5% presentó una media de 10,41, una desviación estándar 0,64, con la cual se obtuvo un mayor coeficiente de variabilidad de 6,14%

Palabras claves: Bioenergía, material lignocelulósico, fermentación, biocombustible

ABSTRACT

The objective of the research project was to obtain ethanol from the brachiaria grass (*Brachiaria brizantha* (A.Rich.) Stapf), after pretreatment with hot liquid water (LHW) and subsequent acid and enzymatic hydrolysis. To this end, the effect of acid and enzymatic hydrolysis on the conversion of brachiaria grass cellulose was evaluated and the efficiency in obtaining alcohol in hydrolysed lignocellulosic liquid was compared in two levels of cellulase enzyme concentration. The grass samples were subjected to dehydration, grinding and conditioning with pretreatment with hot liquid water, to then be hydrolyzed with 5% sulfuric acid at a ratio of 1:5 and enzymatic hydrolysis at 5% and 8% for 14 hours. Subsequently, the samples were subjected to fermentation with addition to the cellulose juice with yeast *Sacharomyes cerevisiae* in a ratio of 0,5% in anaerobic conditions. After fermentation, the samples were subjected to distillation at 100 ° C. The results show that the acid hydrolysis process with sulfuric acid achieved a conversion of lignocellulosic material into soluble solids of 2,8 ° Brix in 16 hours; in enzymatic hydrolysis at 5% and 8% concentration of enzymes subjected to a temperature of 50 ° C, 25,2 and 28,2 ° Brix, were reached, respectively. In the conversion of cellulose into sugars expressed in Solubles Solids (° Brix), shows the adjustment of these data to a kinetic model established by Michaelis establishes values of the parameters of V_{max} , n and K , of $20,87376 \pm 0,984$, $2,6522 \pm 0,17242$ and $7,0622 \pm 1,47156$ respectively, with a coefficient of determination to the adjusted model of 0,98885, which indicates that for a level of confidentiality of 95% the model fits very well to the experimental data. In the process of conversion of cellulosic liquid to ethanol, yields of 40,98% were obtained for the cellulose liquid hydrolyzed with 5% enzyme and 42,98% for the hydrolyzed liquid 8%. They presented coefficients of variability of a low standard deviation value of 0,20 and a lower coefficient of variability of 1,65%, compared to the treatment with enzyme concentration of 5% presented a mean of 10,41, a standard deviation 0.64, with which a higher coefficient of variability of 6,14%.

Keywords: Bioenergy, lignocellulosic material, fermentation, biofuel

I. INTRODUCCIÓN

En el departamento de Madre de Dios el pasto brachiaria es uno de los cultivos de mayor cantidad de producción por ende puede convertirse en una fuente importante para la producción de etanol en el 2012 ocupó una superficie de 15 844 hectáreas, en las cuales fueron producidas 634 943 toneladas similar a la producción del 2011 (Dirección Regional Agraria, MDD 2012). El uso de “biomasa lignocelulósica para la producción de biocombustible, tiene varias ventajas como son: no tendría una competencia con la producción de alimentos debido a que se pueden emplear tierras marginales o degradadas por la agricultura, se utilizarían tierras no destinadas para el cultivo de alimentos, presentaría un bajo costo que las materias primas convencionales, se podría realizar mezclas de variedades y además serían una fuente de recursos renovables y abundantes para la bioconversión a azúcares” (Sánchez-macías y Rodríguez 2009; Cardona, Rios, & Peña, 2012).

La producción de etanol a partir de residuos agrícolas o forestales se presenta como una alternativa renovable pues los materiales lignocelulósicos de la brachiaria son abundantes y pueden ser relativamente baratos si con las técnicas identificadas se producen en gran escala.

El uso de biomasa celulósica de brachiaria en la producción de etanol conlleva a muchos beneficios ambientales porque puede reducir la emisión de gases de combustión de vehículos; Así mismo, reduce considerablemente los riesgos de incendios forestales que son frecuentes en la zona en temporadas de sequía.

Los objetivos que persigue el presente trabajo son:

1.1 Objetivo General

- Obtener etanol a partir del pasto brachiaria (*Brachiaria brizantha* (Hochst. Ex A. Rich.) Stapf), previo pretratamiento con agua líquida caliente (LHW) y posterior hidrólisis ácida y enzimática

1.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la hidrólisis ácida y enzimática sobre la conversión de celulosa de pasto brachiaria (*Brachiaria brizantha* (Hochst. Ex A. Rich.) Stapf),
- Comparar la eficiencia en la obtención de alcohol en líquido lignocelulósico hidrolizado en dos niveles de concentración de celulosa.

II. JUSTIFICACIÓN

“En el mundo se produce alrededor de 30 mil millones de litros de etanol al año, de los cuales el 45% se produce a partir de la caña de azúcar y un fuerte porcentaje se produce a base de maíz” (Mäser et al., 2005). Según Viñals-Verde et al. (2012) “la producción de etanol de maíz es una tecnología establecida, pero es una fuente básica de alimentación mundial” (Gray, 2007; Erickson, 2007). “La búsqueda de una alternativa renovable debe lograrse mediante el uso de materiales lignocelulósicos para producir etanol, debido a ser abundantes y relativamente baratos” (Viñals-Verde et al., 2012).

En Madre de Dios al pasto *brachiaria* no se le da uso y manejo idóneo, por lo cual pueden ser aprovechados de manera óptima y eficiente para satisfacer las diferentes necesidades generadas por el constante desarrollo y crecimiento económico del departamento. Países como Brasil y Estados Unidos están sustituyendo parte de combustible fósil por etanol, además en el Perú existen proyectos para la obtención de este producto, los cuales están localizados en el departamento de San Martín y Piura.

La presente investigación pretende medir la eficiencia de la obtención de etanol a partir de materiales forestales como la *brachiaria* (*B. brizantha*), por hidrólisis ácida y enzimática de esta manera la incorporación de energía renovable limpia generaría excedentes económicos y sobre todo contribuiría con la reducción de la contaminación ambiental y no sería un riesgo para la competencia alimenticia.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 ANTECEDENTES

En la investigación realizada por Mateus et al. (2012) titulada “Evaluación del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido del pasto maralfalfa (*Pennisetum glaucum* x *Pennisetum purpureum*) para la producción de etanol”. El objetivo de su investigación fue evaluar la producción de etanol a partir de pasto maralfalfa (*Pennisetum glaucum* x *Pennisetum purpureum*) a través de pretratamientos con ácido sulfúrico diluido empleando diferentes temperaturas (110, 130, 150, 170 y 190 °C) y concentraciones de ácido (0.8, 1.2, y 2.0% (p/p)), seguido de un proceso de hidrólisis enzimática empleando enzimas comerciales (*Trichoderma reesei* con una actividad de 30UPF/g celulosa y β -glucosidasa de *Aspergillus niger* con una actividad de 400 UI/g celulosa) y un proceso de hidrólisis y fermentación simultánea. Las mejores condiciones de operación del pretratamiento fueron 190°C y 1.2 % (p/p) de ácido sulfúrico con lo cual se obtuvo sólidos con 39.68 % de celulosa y 1.85% de hemicelulosa, el cual al ser hidrolizado con las enzimas comerciales produjo 0.128 g de glucosa y 0.006 g de xilosa por gramo de maralfalfa; en el proceso de hidrólisis y fermentación simultánea del pasto pretratado a estas condiciones produjo 0,117 g de etanol /g de pasto pretratado, obtuvieron el 60,7% del rendimiento de etanol esperado.

Según investigación realizada por Soares, Marques, Benachour, & Abreu, (2011) “Ethanol Production by Enzymatic Hydrolysis of Elephant Grass”. El objetivo fue evaluar la eficiencia de la producción de etanol previo pretratamiento de agua líquida caliente (LWH) por hidrólisis enzimática de pasto elefante morado (*Pennisetum purpureum* Schum) utilizando una mezcla de celulasas. Emplearon 300 gr. de pasto elefante púrpura tamizado el cual fue sometido a pretratamiento del agua caliente a 100 °C durante un período de 25 min en una autoclave discontinua del reactor. La pulpa obtenida del proceso de pretratamiento fue sometida a hidrólisis enzimática utilizando una combinación de exoglucanasas, endoglucanasas y beta- glucosidasas o β -glucosidasas de Novozymes. El pH del sistema se mantuvo constante a 4,8 y la hidrólisis enzimática se produjo a 50 °C con la agitación a 200 rpm en un agitador durante 72 horas. El hidrolizado fue fermentado usando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en 30 °C durante 10 horas. Los líquidos obtenidos después de la fermentación fueron analizados mediante HPLC para determinar la cantidad de etanol producido. Después de 4 horas de fermentación, la cantidad máxima de etanol fue de 1,8 g/L. El rendimiento estequiométrico de etanol fue de

aproximadamente 95%. Sin embargo, la etapa de pretratamiento se consideró insatisfactoria debido a la pérdida de la glucosa durante el proceso de pretratamiento. Los resultados obtenidos en la hidrólisis enzimática de pasto elefante pretratados (rendimiento del 89,74%) y en la fermentación del hidrolizado enzimático subsiguiente (rendimiento del 94,44%) se consideraron satisfactorios, indicando la idoneidad de la biomasa para la producción de etanol.

4.2 MARCO CONCEPTUAL

Pasto Brachiaria

“*La Brachiaria brizantha* cv, Toledo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT 26110), es originario de África Oriental, fue recolectada específicamente en la región de Cibitoke en Burundi entre 1984 y 1985, desde donde fue introducida a Brasil en 1986, como cultivo in vitro en tubos de ensayo, mediante convenio de cooperación científica con el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), con sede en Cali, Colombia. Allí fue sometido a cuarentena por Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnología. Su nombre es de origen Tupiguaraní en homenaje al lugar donde se ha evaluado, en Mato Grosso do Sul” (Jardín, 2011 citado por Salinas 2012).

Salinas (2012) menciona que “después de 15 años de evaluaciones fue liberado en 2003 por EMBRAPA como CIAT 26110 o 004308 bajo el registro SNPA BRA N° 04.509 en el Registro Nacional de Protección de Variedades Vegetales. Se desarrolló bajo convenio entre EMBRAPA Ganado de Carne, la Comisión Estatal de Investigaciones del Cultivo del Cacao del Centro de Investigación del Cacao (CEPLAC/CEPEC) en el estado de Bahía, el Instituto de Zootecnia (IZ) con sede en Nova Odessa/SP y EMBRAPA Cerrados (Sabanas). Se usa para pastoreo y puede ser henificada o ensilada”.

“Según el seguimiento dado al cultivo desde la etapa de germinación la semilla tiene diferentes procesos, las primeras raíces se denominan embrionarias y viven poco tiempo, pues son sustituidas por la raíz permanente, verdadera, la cual carece de nudos y escamas. Posteriormente, se desarrollan las raíces adventicias o secundarias, caracterizadas por un gran número de raíces fibrosas ramificadas y densas, que ofrecen un gran soporte a la planta y le facilitan su nutrición, estas últimas raíces se caracterizan por presentar nudos y escamas. En general, las raíces pueden llegar a alcanzar hasta unos 30 cm de profundidad, pero se han encontrado algunas a una profundidad mayor” (Ramírez, 2004; citado por (Salinas, 2012).

Clasificación Taxonómica

La *B. brizantha* es originaria de las regiones tropicales de África en donde crecen normalmente de forma natural en sabanas abiertas o en compañía de especies arbustivas. Pertenecen a la división *Magnoliophyta*; clase *Magnoliopsida*, subclase *Commelinidae*; orden *Poales*; familia *Poaceae*; subfamilia *Panicoideae*; tribu *Paniceae* por los Hermanos León y Yepes, citado por (Olivera, Machado, Del Pozo, 2005)

Material lignocelulósico

Abril & Navarro, (2012) afirman que “las plantas aprovechan la radiación solar para su metabolismo a través de la fotosíntesis, que es un proceso mediante el cual éstas transforman la energía solar en energía química. El proceso fotosintético está constituido por un complejo entramado de reacciones fotoquímicas y bioquímicas que ocurren en los cloroplastos de la célula, la cual es la verdadera fábrica de energía que sostiene la vida. La energía química se refiere a la implicada en la formación o la rotura de enlaces entre los átomos que forman las moléculas”.

Del mismo modo mencionan que “la energía química se almacena en forma de moléculas orgánicas como la glucosa, fabricada por las plantas en la fotosíntesis con fines de almacén energético. La glucosa, un azúcar de 6 carbonos, es el combustible sintetizado en primer lugar; posteriormente los monómeros de glucosa se polimerizan dando lugar a las macromoléculas que forman los polisacáridos. El almidón en los vegetales y el glucógeno en los animales son los polisacáridos que constituyen las reservas de energía de la vida vegetal y animal. La molécula de almidón está formada por unas 3 000 unidades de glucosa mientras que el glucógeno por 12 a 18 unidades” (Abril & Navarro, 2012).

“Para un mejor entendimiento de lo que es la biomasa lignocelulósica y poder aprovecharla, se deben conocer cuáles son los componentes principales de las paredes celulares y estos a su vez, se pueden dividir en tres fracciones orgánicas con las siguientes composiciones representativas en peso seco: 20% -50% de celulosa, 15% -35% de hemicelulosa y 10% -30% de lignina. Además, también contiene cantidades más pequeñas de otros componentes minoritarios; proteínas (3-10%), lípidos (1.5%), azúcares solubles, denominados extractivos y minerales (10.5%), que en los análisis químicos se estiman como cenizas” (Morales, 2015).

Celulosa

“En su mayoría, los carbohidratos presentes en la naturaleza se encuentran en forma de polisacáridos, estos no solamente están compuestos por azúcares unidos por enlaces glucosídicos, sino también pueden contener estructuras sacáridos poliméricas unidas por enlaces covalentes a aminoácidos, péptidos, proteínas, lípidos y otras estructuras” (Perez et al., 2002) citados por Medina-Morales, Lara-Fernández, Aguilar, & de la Garza-Toledo, (2011)⁴

“La celulosa es el polímero más abundante de la naturaleza, recibe el nombre de biopolímero ya que forma parte de estructuras biológicas vegetales. Su estructura está formada por monómeros de glucosa unidos por enlaces en el carbono 1 y el carbono 4 por medio de una unión β , es de peso molecular alto” (Laureano-Pérez, 2005) citado por Medina-Morales et al., (2011).

Hemicelulosa

“La hemicelulosa es una estructura compleja de carbohidratos que consiste de diferentes polímeros, tales como: pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, manosa y galactosa), y ácidos urónicos. El componente hemicelulósico principal de algunos materiales vegetales como maderas duras son los xilanos y en maderas suaves el glucomamano. Este polímero es de peso molecular más bajo que la celulosa y contiene ramificaciones con celulosa las unidades de glucosa están unidas por enlaces β 1-4 y en la α -amilosa el enlace es α 1-4. La conformación más estable conferida por enlaces glucosídicos es dada por el enlace β 1-4, ya adopta que una conformación extendida, referida como un listón extendido. La posición de los polímeros de esas cadenas permite un eficiente interencadenamiento por medio de puentes de hidrogeno, que es la base de la fuerza de la celulosa” (Garret & Grisham, 1996).

Lignina

“Después de la celulosa y hemicelulosa, la lignina es uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza. Es un heteropolímero amorfo que consiste de tres diferentes unidades fenilpropano (p-coumaril, coniferil y alcohol sinapil) unidos por diferentes tipos de enlaces. El principal propósito de la lignina es dar soporte estructural a la planta, impermeabilidad y resistencia a ataques microbianos o a stress oxidativo. Este polímero es insoluble en agua y ópticamente inactivo, en conjunto hace que la degradación de la lignina sea difícil” (Fengel & Wegener, 1984).

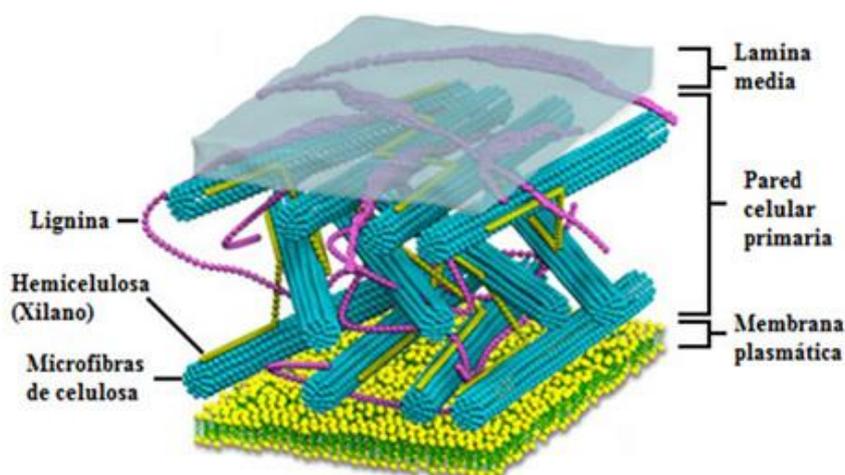


Figura 1. Estructura de la biomasa celulósica

Imagen tomada de

www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%207/7.html, 2012

Composición de lignina y celulosa en brachiaria

Arias & Hernández, (2002) reportan que el porcentaje de Lignina obtenido en la planta integral de brachiaria fue de 7,95% y en las hojas 6,36%, igualmente que la planta integral supera siempre a las hojas, dada la condición de mayor lignificación en los tallos que en las hojas solas. De acuerdo a estos resultados, esta pastura presentó valores de FDN (Fibra Neutra Detergente) superiores a 65% y % Lignina por encima de 5% lo cual le da una característica en cuanto a su valor nutritivo de mediana a baja calidad.

El porcentaje de Celulosa obtenido en la planta integral fue de 34,26% y en las hojas de 32,79%, notándose en los datos puntuales que la planta completa siempre estuvo por encima de las hojas.

Importancia del material lignocelulósico

“La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas, esta biomasa producida por la fotosíntesis es la fuente de carbono renovable más prometedora para solucionar los problemas actuales de energía. El principal impedimento tecnológico para la utilización de la biomasa vegetal es, en general, la ausencia de una tecnología de bajo costo dirigida a la recalcitrancia de la lignocelulosa. Se han desarrollado diversos métodos que mejoran la hidrólisis de la lignocelulosa, como los pretratamientos fisicoquímicos y biológicos” (Cuervo, Folch, & Quiroz, 2009).

Fermentación

Juri, (2011) define a la “fermentación como un proceso biológico de oxidación incompleta realizada por microorganismos los cuales obtienen energía a partir de una fuente de carbono. Existen diversas fermentaciones, pero la que interesa en este trabajo es la fermentación alcohólica, donde un MO en ausencia de oxígeno transforma la glucosa en etanol y CO₂, obteniendo energía para llevar a cabo el metabolismo”.



“Para un proceso fermentativo que tiene como finalidad un proceso industrial productivo es de suma importancia contar con algún microorganismo que entregue un alto rendimiento de bioetanol, alta productividad y que sea capaz de tolerar altas concentraciones de bioetanol” (Juri, 2011).

Para el proceso de fermentación se utiliza la levadura *Sacharomyces cerevisiae* que es una levadura usada para la producción de vinos con rendimientos superiores a 43% (g etanol/g de glucosa)(Olofsson, Bertilsson, & Lidén, 2008)

Etanol de celulosa o bioetanol

El etanol o alcohol etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) “es una importante especie química orgánica por sus propiedades únicas y sus variados usos. Bajo condiciones ordinarias, el etanol es volátil, inflamable, se encuentra en estado líquido, incoloro, miscible en agua y en solventes no polares” (Cortínez, 2010).

Akhtar (2008) define al etanol de celulosa como “un tipo de combustible producido a partir de la celulosa contenida en la biomasa de plantas tales como pastos, arbustos y árboles. La mayor parte de la masa de las plantas está compuesta de lignocelulosa, que incluye celulosa, hemicelulosa y lignina. La conversión de la celulosa en etanol implica dos pasos fundamentales”: “Cortar las cadenas largas de las moléculas de celulosa dejando así libres a la glucosa y otros azúcares, y fermentar esos azúcares para su conversión en etanol”.

“En la naturaleza, tales procesos son llevados a cabo por diferentes organismos: hongos y bacterias que usan enzimas (celulasas) para liberar el azúcar contenido en la celulosa, y otros microbios, en particular levaduras, que fermentan los azúcares y los transforman en alcohol” (Akhtar 2008).

“El bioetanol es un biocombustible de origen vegetal que se produce a partir de la fermentación de materia orgánica (caña, remolacha o uva) rica en azúcar, así como de la transformación en azúcar del almidón presente en los cereales. Se utiliza en motores de explosión como aditivo o sustitutivo de la gasolina” (Gracia, 2004). “La producción de bioetanol se basa en un proceso bioquímico bien conocido: la fermentación alcohólica. En todos los casos se parte de almidón o celulosa. Una vez hidrolizados para obtener glucosa, ésta se somete a fermentación de donde se obtiene el etanol. En las primeras etapas de la fermentación, cada molécula de glucosa se transforma en dos moléculas de ácido pirúvico. A partir de dicho ácido, diferentes rutas metabólicas conducen a la formación de otros tantos productos finales. En la fermentación alcohólica, que llevan a cabo las levaduras, el producto final resultante es el etanol y, en menor proporción otro alcohol” (Gracia, 2004)

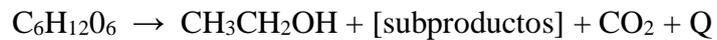
La fermentación alcohólica

Ribéreau-Gayon, Glories, Maujean, & Dubourdieu, (2006) define al “proceso de fermentación alcohólica como, el proceso es conocido de antiguo y de su observación se aprecian la típica agitación de la masa líquida (no en vano *fermentar* procede del término latino *fervere*, que significa hervir) debida a la abundante generación de CO_2 , y un notable desprendimiento de calor”.

“También es conocido que, durante el proceso, el mosto cambia de composición, de manera que pasa de ser un líquido en el que predominan los azúcares, a otro en el que predomina el etanol. Hay también un cambio importante en el sabor y el aroma. El gusto dulzón y floral del mosto da paso a un sabor y un aroma de gran complejidad en el vino, donde se adivinan innumerables componentes” (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

“Podemos, por tanto, fácilmente plantear que la fermentación es un proceso en el que la glucosa es transformada por un microorganismo en etanol y en una serie de productos con especiales cualidades sensoriales (olor y sabor) y con desprendimiento de gas carbónico (CO₂) y de calor” (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

La fermentación alcohólica puede resumirse en la siguiente ecuación:



“Esta misma transformación se produce en la elaboración del pan, con la diferencia de que el etanol se evapora en el horneado y el CO₂, al escapar con dificultad por la consistencia de la masa, la levanta y esponja” (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

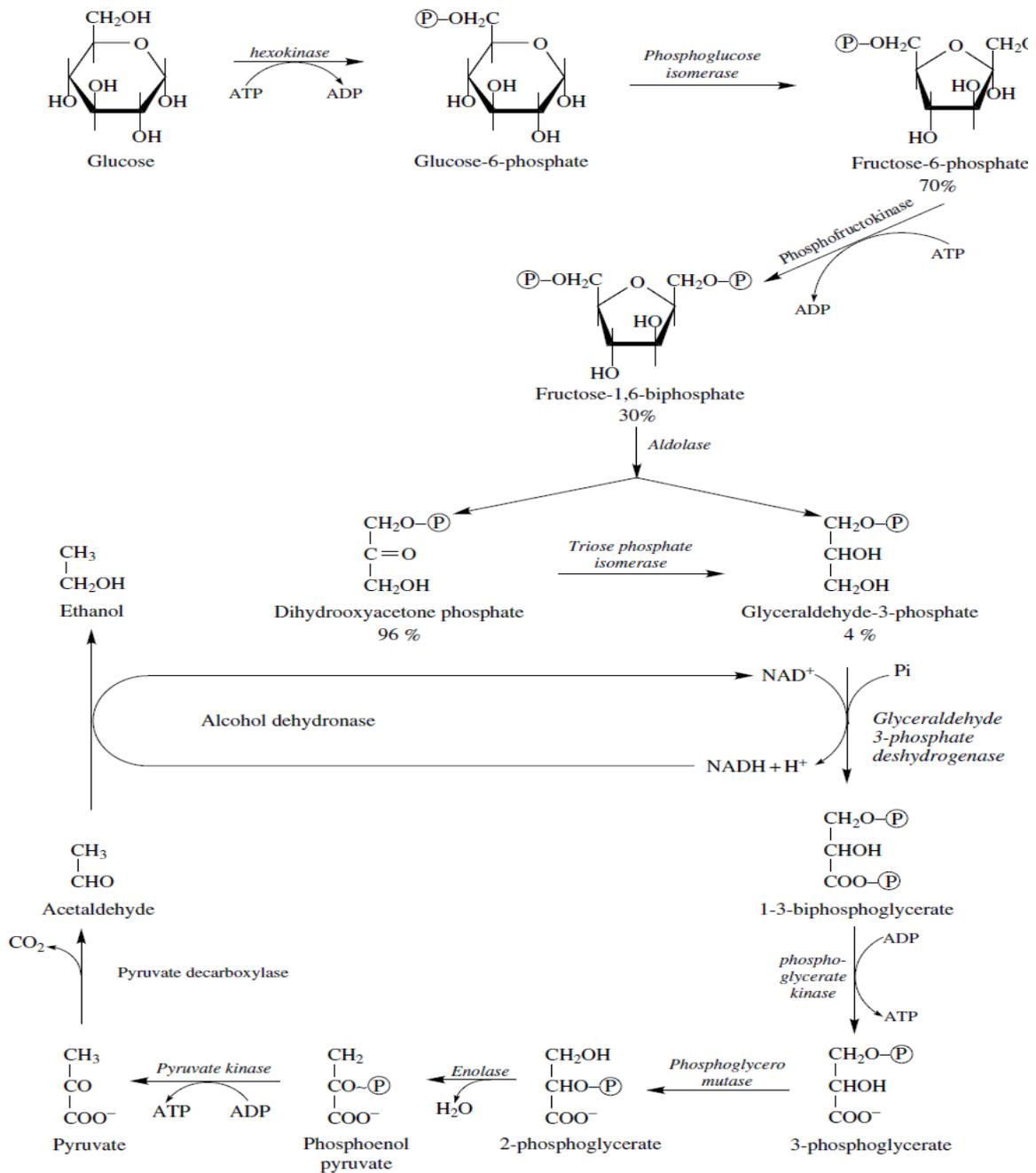


Figura 2. Ruta de la glicolisis y fermentación alcohólica

Fuente: (Moreno & Peinado, 2012)

Ventajas y desventajas del bioetanol

Cortínez (2010), menciona que, “entre las distintas opciones de biocombustibles, el etanol constituye una alternativa particularmente interesante dado que”: “(1) 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. (2) Es virtualmente utilizable en todos los vehículos, siendo fácil de producir y almacenar. (3) Su combustión sólo produce CO₂ y agua. El CO₂ producido es principalmente neutro (sin impurezas) y dependiendo de la ruta de conversión de la biomasa en combustible y mediante el uso de aditivos, este puede ser utilizado y vendido comercialmente. (4) Reduce las emisiones de CO₂ al quemarse que la gasolina, pero el impacto total depende del pro-ceso de destilación y la eficiencia de los cultivos. (5) Reduce las emisiones de CO en un 25% a 30% cuando con el 10% de etanol en la mezcla. (6) Su combustión en motores aporta los menores niveles de gases de efecto invernadero (entre un 12 y un 26%), siendo el transporte el sector económico generador del mayor porcentaje de este tipo de gases a escala global” (Cortínez, 2010).

Hidrolisis del material lignocelulósico

La biomasa lignocelulósica, que viene de la parte estructural de las plantas, pueden ser hidrolizada para producir componentes químicos que a su vez pueden ser utilizados como fuentes renovables de carbono para producir biocombustibles y compuestos químicos. En apartados anteriores, se ha estudiado que la biomasa lignocelulósica está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. La ruptura de estos da lugar a la formación de compuestos químicos que pueden ser utilizados para la producción de biocombustibles y compuestos químicos. La celulosa es un polímero de glucosa que puede ser despolimerizado a través de hidrólisis en monómeros, estos se pueden utilizar en una biorrefinería de azúcares para producir combustibles con alta densidad de energía y productos químicos (Morales, 2015).

El enfoque conceptual para despolimerizar celulosa en monómeros de azúcar es similar a la seguida durante décadas en las refinerías de petróleo convencionales para producir combustibles y productos químicos. Por lo tanto, se cree que, en el futuro, diferentes plataformas de biorrefinería (termoquímica, lípidos y/o bioquímica) puede suministrar biocombustibles renovables y productos bioquímicos para sustituir, al menos en parte, a los obtenidos a partir de recursos fósiles. El desarrollo de los biocombustibles de segunda y tercera generación solo será posible mediante el uso eficiente de la biomasa

lignocelulósica y las microalgas para la producción de biocombustibles a gran escala, estas fuentes de biomasa no compiten de forma directa con la producción de alimentos como es el caso de algunos biocombustibles de primera generación hecho de maíz, caña de azúcar y soja (Morales, 2015)

Tecnologías convencionales para la producción de etanol

“La producción de etanol por la fermentación de materias primas de origen vegetal ricas en azúcares o almidones, (granos, tallos, raíces, etc.), es una de las técnicas más utilizadas por el hombre. Se cree que los chinos fueron los primeros en destilar el alcohol directamente a partir del licor fermentado de arroz, cerca del año 800 A.C. Mientras que los pasos básicos permanecen los mismos, el proceso ha sido refinado considerablemente en los años recientes, conduciendo a un proceso muy eficiente” (Diaz & Herrera, 2002)

Hidrolisis

(Abril & Navarro, 2012) afirman que “la hidrólisis se puede realizar catalizada por ácidos, bases, calor y con la ayuda de microorganismos y tiene por objetivo convertir la masa viscosa obtenida en la etapa anterior en una solución de azúcares en forma de oligómeros para después convertir los azúcares oligoméricos en azúcares monoméricos, en general glucosa (C6) y xilosa (C5)”.

“Los pretratamientos e hidrólisis ácidos son de los más empleados en los procesos industriales y tienen la ventaja de que separan azúcares monoméricos de las hemicelulosas y exponen a las fibras celulósicas a la acción hidrolítica posterior” (Abril & Navarro, 2012).

Hidrolisis ácida

“Los ácidos como el H_2SO_4 y HCl concentrados son poderosos agentes que hidrolizan la celulosa, pero son tóxicos, corrosivos y peligrosos por lo que requieren reactores que resistan su corrosión. Se emplean altas temperaturas y ácidos diluidos que hidrolizan la hemicelulosa en azúcares solubles en agua, en los residuos queda la celulosa y la lignina, esta última se extrae con solventes orgánicos. El pretratamiento con ácidos mejora la hidrólisis de la celulosa, pero su costo es alto en comparación con otros pretratamientos y requiere una neutralización del pH para evitar la inhibición de la fermentación” (Eggeman & Elander, 2005).

Hidrolisis enzimática

“En la hidrólisis enzimática de la celulosa, recientemente se ha venido hablando de los celulosomas. Estos son complejos enzimáticos que actúan sinérgicamente para catalizar la hidrólisis de este polisacárido. Estos complejos están formados esencialmente por varios tipos de celulasas que están soportadas en una unidad de estructuración constituida por múltiples cadenas de polipéptidos, cuyo número varía de un microorganismo a otro e incluso difiere entre cepas, con dominios catalíticos muy parecidos a las células libres degradadoras de material lignocelulósico” (Hernández Santoyo, A., García Hernández, E., & Rodríguez Romero, 1999).

“Actualmente se ha estado trabajando en construcción de celulosomas robustos sintéticos como Rosettazyme que asociadas a celulasas, han presentado una mayor actividad que las enzimas libres” (Mitsuzawa et al, 2009)

Conversión de la sacarosa a etanol

La sacarosa, principal componente de los tejidos vegetales, “se descompone por hidrólisis en glucosa y fructosa. Estos azúcares pueden ser convertidos directamente a etanol por enzimas producidas por variedades específicas de levaduras (*saccharomyces cerevisie*), y bacterias” (Díaz & Herrera, 2002).

“Convencionalmente, los pasos comprendidos en la producción de azúcar y alcohol a partir de la caña de azúcar difieren solamente en las etapas que siguen a continuación de la extracción del jugo de la caña, el cual puede ser, en un caso fermentado para producir etanol, o, en otro, tratado para producir azúcar” (Díaz & Herrera, 2002).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Materiales y equipos.

- Balanza de precisión capacidad 6,100 g y Balanza analítica Marca Sartorius Capacidad 210g con rango de lectura 0,0001



Figura 3. Balanza de precisión y balanza analítica

- Autoclave vertical de 3.0 Litros Marca A&C Ingenieros construida en láminas de acero inoxidable alimentada con vapor.



Figura 4. Autoclave Vertical de acero Inoxidable

- Bandejas de acero I
- Bandejas de plástico de 20 litros
- Bolsas de Polietileno de alta densidad
- Incubadora convectiva MM 50 Litros de Capacidad procedencia Alemania



Figura 5. Incubadora convectiva MM Alemania

- Equipo de destilación, capacidad de 1Litro



Figura 6. Equipo completo de destilación de alcoholes

- Refractómetro digital Marca NR-151



Figura 7. Refractómetro Digital

- Alcoholímetro Marca Alambik con rangos de lectura para alcohol y etanol con grados de lectura de -5 a +5%



Al-Ambik.com

Figura 8. Alcoholímetro para medir grados alcohólicos

- Termómetro de mercurio con rangos de temperatura de 0° a 200°C
- Pipetas de 10 ml
- Vasos de precipitado de 500ml y de 1000ml
- Potenciómetro de mesa marca Metrohm



Figura 9. Potenciómetro digital de mesa

Insumos:

- Sepas liofilizadas de Celulasa.
- Ácido sulfúrico.
- Hidróxido de sodio

4.2 Métodos

Para el desarrollo de la presente investigación se procedió a implementar el procedimiento que se muestra en la siguiente figura:

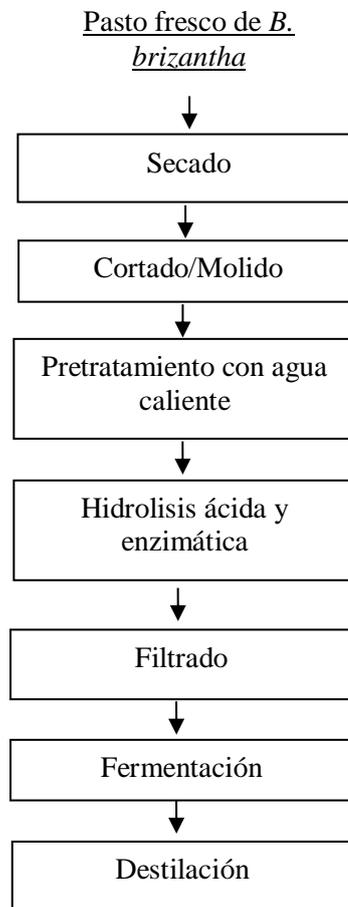


Figura 10. Flujo de proceso para obtención de etanol a partir de hoja de *B. brizantha*

Descripción del proceso de obtención de etanol a partir de pasto brachiaria

1. Las hojas frescas de brachiaria fueron colectadas en el distrito de las Piedras, sector Madama
2. Las hojas frescas fueron sometidas a secado solar hasta alcanzar humedad de 5%
3. Sometidas a tratamiento de ablandamiento con agua caliente a presión a temperatura de 170°C en la autoclave vertical volcable por un tiempo de 46 minutos (tal como lo recomienda Lynd et al, 2002).



Figura 11. Proceso de ablandamiento de las hojas de brachiaria Fuente: Elaboración propia 2017

4. Las hojas ablandadas fueron sometidas a proceso de molienda
5. Posteriormente se somete a hidrolisis ácida con ácido sulfúrico (H_2SO_4) Luego las muestras por triplicado fueron acondicionadas en vasos de precipitado de 1L fueron sometidos a hidrolisis ácida con ácido sulfúrico (5%) en razón de 1/10 (relación sustrato celulósico/ solución de ácido sulfúrico) por un lapso de 14 horas.



Figura 12. Proceso de hidrolisis ácida Fuente. Elaboración propia 2017

6. Luego por medio de filtrado se procede a separar la celulosa convertida que se encuentra en el líquido. Seguidamente se procede a estabilizar el jugo celulósico con Hidróxido de Sodio hasta alcanzar un pH de 5 y acondicionado a una temperatura de la solución de $50^{\circ}C$, para proceder a la inoculación de la enzima, (la cual fue

previamente activada) en razón de 5 y 8% (p/v) por un espacio de tiempo de 16 horas.

7. Posteriormente se procedió a realizar la fermentación del líquido. Al jugo lignocelulósico se inoculó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* al 0,5% de levadura en condiciones anaerobias en frascos herméticos.
8. Luego de ello se procede al destilado del jugo lignocelulósico en una columna de destilación de 1 litro de capacidad a temperatura de 100°C.

4.3 Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron determinados todos en triplicado, y fueron expresados como la media y el desvío estándar (media \pm desvío estándar). Los resultados de los tratamientos fueron sometidos a comparación múltiple de medias para determinar diferencias significativas entre las medias en cada periodo de análisis (2, 4, 8, 12 y 16 horas). También los datos experimentales correspondientes al incremento del °Brix de cada tratamiento fueron sometidos a análisis de regresión no lineal para ajustarlos al modelo cinético establecido por Michaelis (Sousa et al., 2011):

$$C(\text{°Brix}) = V_{\max} \left(\frac{t^n}{K^n + t^n} \right)$$

Donde:

C : Concentración de sólidos solubles (°Brix)

V_{\max} : Velocidad de reacción enzimática

t^n : Concentración del sustrato en el inicio

K^n : Constante de Michaelis-Menten

V. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Composición de celulosa y lignina en *B. brizantha*

La composición de celulosa y lignina en hojas de pasto brachiaria se presentan en el siguiente Tabla.

Tabla 1. Composición de Celulosa y Lignina en hojas de *Brachiaria brizantha*

Compuesto	Porcentaje	Método de determinación
Celulosa	32,57%	Método modificado de Kurschner y Hoffer (Technical Association for the Pulp and Paper Industries, 1978)
Lignina	5,10%	Norma TAPPI T 222 os-74 (Technical Association for the Pulp and Paper Industries, 1978),

Fuente. Elaboración propia

Los datos presentados en la Tabla 1 fueron similares a los reportados por (Arias & Hernández, 2002) quien reporta que el contenido de lignina fue del 7,95% y en las hojas 6,36%, y el porcentaje de Celulosa obtenido en la planta integral fué de 34,26% y en las hojas de 32,79%. Las ligeras diferencias entre los contenidos se deben a que (Arias y Hernández, 2002) trabajaron con *B. humidícola*, mientras que la especie investigada en el presente trabajo fue *B. brizantha*.

5.2 Conversión de celulosa en azúcares mediante hidrólisis ácida

Los resultados de la conversión de celulosa en azúcares en la hidrolisis ácida se presentan a continuación.

Tabla 2. Conversión de celulosa de *Brachiaria* en azúcares mediante el proceso de hidrolisis ácida con H₂SO₄

	Conversión % sólidos/hora (Promedio)				
	2	4	8	12	16
Conversión en sólidos (°Brix)*	2,5±0,20 ^b	19,8±1,65 ^a	20,1±1,64 ^a	20,7±1,31 ^a	21,8±0,26 ^a

Fuente. Elaboración propia

*Calculadas en base a 100g de material lignocelulósico hidrolizado

Los datos de la tabla anterior muestran la evolución en la conversión de celulosa en azúcares expresados en Sólidos Solubles ($^{\circ}$ Brix); así mismo, la Figura 13, muestra el ajuste de estos datos a un modelo cinético establecido por Michaelis (Sousa, Carvalho, Giordano, & Giordano, 2011), estableciéndose los valores de los parámetros de V_{max} , n y K , de 20.87376 ± 0.4984 , 2.6522 ± 0.17242 y 7.0622 ± 1.47156 respectivamente, con un coeficiente de determinación al modelo ajustado de 0.98885, que nos indica que para un nivel de confiabilidad del 95 % el modelo ajusta muy bien a los datos experimentales así como los coeficientes según el test de student, Tabla 3. Estos datos nos indican que en los primeros 4 horas de hidrólisis ácida se producen alrededor del 90 % de conversión de celulosa en azúcar alcohólico, resultados comparables con los reportados por (Komanoya, Kobayashi, Hara, Chun, & Fukuoka, 2014) para la celulosa, y por debajo de los reportados por (Tejeda, Quintana, Pérez, & Young, 2011) en trabajos similares realizados con hojas de maíz, a pesar de que la composición de celulosa es similar; sin embargo ello también se justifica debido a que los mismos investigadores realizaron un proceso de hidrólisis con NaOH, lo que pudo favorecer la conversión. De la Tabla 2, se puede observar que los datos a 4, 8 y 12 horas tienen mayor variabilidad de los datos a los 2 y 16 horas, esto debido a la mayor dinámica de conversión de celulosa en azúcar a las 4 horas, también puede ser por la sensibilidad del instrumento de lectura del $^{\circ}$ Brix.

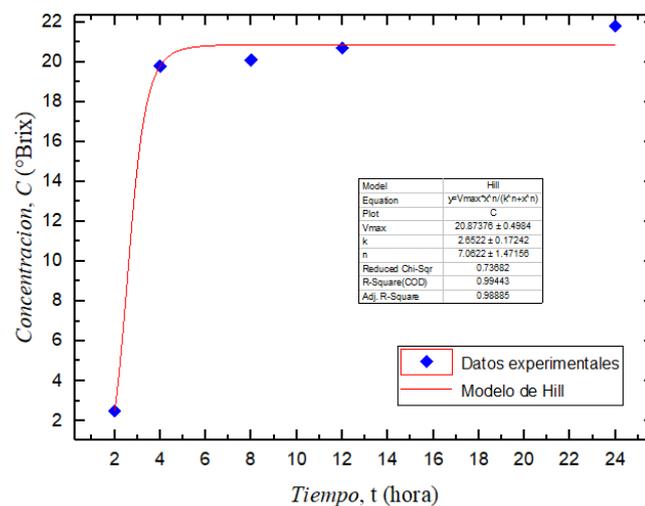


Figura 13. Conversión de celulosa en azúcares ($^{\circ}$ Brix) mediante hidrólisis ácida con H_2SO_4

Tabla 3. Coeficientes del modelo cinético para la conversión de celulosa en azúcares mediante hidrólisis ácida

Coeficientes	Valor	Error estándar	t – valor	Prob> t	Dependencia
Vmax	20,87376	0,4984	41,88115	5,69628E-4	0,2418
k	2,6522	0,17242	15,38189	0,0042	0,40895
n	7,0622	1,47156	4,79911	0,04078	0,39866

Fuente. Elaboración propia

$$\text{Chi}^2 = 0.73682, \text{SCR} = 1.47364, \text{R}^2 = 0.99443 \text{ y } \text{R}^2_{\text{Adj}} = 0.98885$$

5.3 Hidrólisis enzimática

Una vez concluida el proceso de hidrólisis ácida se procedió a realizar la hidrólisis enzimática teniendo como variables las concentraciones de enzimas a verter en la solución lignocelulósica y los tiempos de exposición a las enzimas. Los datos se presentan a continuación.

Tabla 4. Conversión de celulosa de *Brachiaria* en azúcares mediante el proceso de hidrólisis enzimática al 5% (p/v) a temperatura constante de 50°C

	Conversión % sólidos/hora (Promedio)				
	2	4	8	12	16
Conversión en sólidos (°Brix)*	5,8±1,55 ^b	16,7±1,57 ^a	18,03±3,12 ^a	22,45±4,54 ^a	25,2±40 ^a

Fuente. Elaboración propia

En la Tabla 4 se puede observar el proceso de conversión de azúcares en el líquido lignocelulósico cuyos valores de conversión fueron superiores a los reportados por (Dagnino et al., 2012), quienes investigaron sobre la hidrólisis enzimática de cascarilla de arroz pretratada con ácido sulfúrico diluido y calor es efectivo para aumentar la accesibilidad enzimática de cascarilla de arroz, habiendo obtenido una conversión del 50% del total de celulosa presente en la cascarilla de arroz pre-tratada. Versus el 78,29% obtenido para la *B. brizantha* en la presente investigación. Ello se debe que además de haber sido sometidas las muestras a hidrólisis ácida fueron so a 170°C por un tiempo de 46 minutos.

En la Tabla 5 se presentan los niveles de conversión de celulosa en sólidos solubles a concentraciones de enzima celulasa de 10% (p/v). Dichos resultados se incrementan levemente respecto al anterior tratamiento de 5%.

Tabla 5. Conversión de celulosa de *Brachiaria* en azúcares mediante el proceso de hidrólisis enzimática al 8% (p/v) a temperatura constante de 50°C

	Conversión % sólidos/hora (Promedio)				
	2	4	8	12	16
Conversión en sólidos (°Brix)*	5,80±1,55 ^d	17,03±1,52 ^c	20,13±2,05 ^{bc}	23,72±3,04 ^{ab}	28,23±1,95 ^a

Fuente. Elaboración Propia

Dichos resultados son similares a los obtenidos por (Sarkar, Ghosh, Bannerjee, & Aikat, 2012) en su investigación sobre hidrólisis enzimática en paja de trigo. Ellos tuvieron rendimientos del 92% en la conversión de celulosa en azúcares, niveles superiores a los resultados obtenidos en la presente investigación que fue de 86.58%, ello puede deberse a que en las condiciones de hidrólisis ácida empleó niveles de temperatura de 160°C.

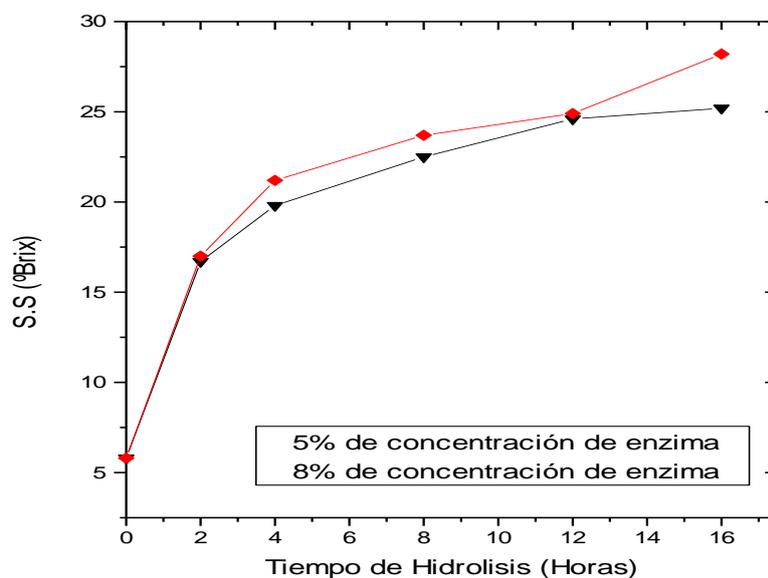


Figura 14. Conversión de celulosa en azúcares (°Brix) mediante hidrólisis enzimática a concentraciones de 5% y 8%

5.4 Obtención de etanol

Durante el proceso de destilación se obtuvieron los resultados que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 6. Obtención de etanol a partir de la destilación de líquido lignocelulósico de *B. brizantha* hidrolizada con dos concentraciones de enzimas

Concentración Enzima	% solidos	R1	R2	R2	Promedio±DE	Valor porcentual
5%	25,4	9,8	10,34	11,08	10,41±0,64 ^b	40,98
8%	28,2	11,9	12,3	12,17	12,12±0,20 ^a	42,98

Donde R1, R2, y R3 son las repeticiones del experimento

Los valores se reportan como gramos de etanol/gramos de solidos contenidos en el jugo celulósico.

Fuente: Elaboración propia

En la tabla mostrada se aprecia la eficiencia en la producción de etanol de líquido lignocelulósico sometido a hidrolisis enzimática en concentraciones de 5 y 8%. Para concentraciones de 5% se tiene una eficiencia en la conversión de azúcares en etanol 43,62% y en el caso de la concentración de enzima celulasa, resultado que coincide con el reportado por (Olofsson et al., 2008) en la evaluación de la eficiencia del uso de levadura *S. cerevisiae* el cual reportó una eficiencia de 0,45g.g⁻¹. Del mismo modo (Capdevila, Kafarov, Gely, & Pagano, 2015) en estudios de obtención de etanol a partir de residuos de arroz obtuvieron rendimientos cercanos al 85%, dichos valores superiores a los encontrados en la presente investigación ello puede a que ellos consideraron dentro de su diseño de investigación el uso de presiones y temperaturas. En la tabla anterior se aprecia que la mayor eficiencia en la obtención de etanol cuando se utilizó una concentración de enzima de 8% con un promedio de obtención de etanol de 12,12g etanol/g de solido contenido en el jugo celulósico, además presentó un bajo valor de desviación estandar de 0.20 y un menor coeficiente de variabilidad de 1,65%, respecto al tratamiento con concentración de enzima de 5% presentó una media de 10,41, una desviación estandar 0,64, con la cual se obtuvo un coeficiente de variabilidad de 6,14%

VI. CONCLUSIONES

1. Los resultados del análisis muestran que el pasto *B. brizantha* presenta contenidos de celulosa de 32,57% y Lignina 5,10%.
2. En la Hidrolisis ácida con H_2SO_4 al 5%, se logró una conversión de 25,2% de solidos durante 16 horas.
3. En la Hidrolisis enzimática con concentraciones de celulasa del 5% (p/v) se obtuvieron rendimientos de conversión de 25,2°Brix durante las 16 horas de exposición a la hidrolisis enzimática. Dicha exposición se realizó a una temperatura de 50°C.
4. En la hidrolisis enzimática con concentraciones del 8% se obtuvieron niveles de conversión del 25,8°Brix durante las 16 horas de exposición. Niveles superiores a las concentraciones de 5%. Debido a una mayor efectividad en el proceso de conversión.
5. En el proceso de conversión de solidos celulasa a alcohol durante el destilado se alcanzaron niveles de eficiencia del 40,98% para el jugo con concentración de celulasa de 5% y 42,98% para concentraciones de 8%.
6. La evolución en la conversión de celulosa en azúcares expresados en Solidos Solubles (°Brix), muestra el ajuste de estos datos a un modelo cinético establecido por Michaelis establece valores de los parámetros de V_{max} , n y K , de $20,87376 \pm 0,4984$, $2,6522 \pm 0,17242$ y $7,0622 \pm 1,47156$ respectivamente, con un coeficiente de determinación al modelo ajustado de 0,98885, lo que nos indica que para un nivel de confidencialidad del 95 % el modelo ajusta muy bien a los datos experimentales
7. Los resultados en la obtención de alcohol sometidos a hidrolisis enzimática con dos concentraciones de enzimas presentaron coeficientes de variabilidad de presentó un bajo valor de desviación estandar de 0,20 y un menor coeficiente de variabilidad de 1,65%, respecto al tratamiento con concentración de enzima de 5% presentó una media de 10,41, una desviación estandar 0,64, con la cual se obtuvo un mayor coeficiente de variabilidad de 6,14%

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar los ensayos a condiciones controladas de presión y temperaturas, pues ello puede aumentar la eficiencia en la conversión de celulosa en alcohol.
2. Se recomienda equipar laboratorio para productos destinados a la obtención de energías limpias a partir de residuos pecuarios, forestales y agrarios
3. Por lo costoso de las enzimas se recomienda desarrollar estudios para aislarlas de bacterias como de desecho digestivo de ganado vacuno.
4. Con el alcohol obtenido realizar pruebas de eficiencia para su uso como carburante en motores de gasolina, sustituyéndolo parcialmente con etanol.
5. Que se realice un estudio de costos para sustentar la viabilidad económica de la obtención de etanol a partir de pasto de brachiaria
6. Que se implemente un sistema de gestión de los residuos ácidos a fin de no contaminar el ambiente.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Abril, A., & Navarro, E. (2012). *Etanol a partir de biomasa Lignocelulósica*. (Aleta Ediciones, Ed.) (Primera Ed). Écija- Sevilla- España: GRÁFICAS SOL.
- Akhtar, M. (2008). Ethanol from cellulose : A technology that could spell disaster What is cellulosic ethanol ? *Fuel*. Retrieved from wrm.org.uy/oldsite/publications/briefings/Ethanol.pdf
- Arias, A., & Hernández, H. (2002). Composición química del pasto aguja (brachiaria humidicola) sometida a pastoreo en una finca del municipio guanare estado portuguesa. *Revista Científica*, 12(2), 562–565.
- Capdevila, V., Kafarov, V., Gely, C., & Pagano, A. (2015). Simulation of the Fermentation Process To Obtain Bioethanol From rice residues. *Avances En Ciencias E Ingenieria*, 6(2), 11–21.
- Cardona, E. M., Rios, L. A., & Peña, J. D. (2012). Disponibilidad de variedades de pastos y forrajes como potenciales materiales lignocelulósicos para la producción de bioetanol en Colombia. *Informacion Tecnologica*, 23(6), 87–96. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642012000600010>
- Cortínez, V. (2010). Comparación De Pretratamientos En Residuos Forestales Para La Producción De Bioetanol De Segunda Generación: Hidrólisis Ácida Y Líquidos Iónicos. *Universidad de Chile*, 122. Retrieved from repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2010/cf-cortinez_vv/pdfAmont/cf-cortinez_vv.pdf
- Cuervo, L., Folch, J., & Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Bio Tecnología*, 13(3), 11–25. Retrieved from http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Lignocelulosa.pdf
- Dagnino, E. P., Roggero, F. S., Morales, W. G., Chamorro, E. R., Felissia, F. E., Area, M. C., & Romano, S. D. (2012). Hidrólisis enzimática de cascarilla de arroz pretratada con ácido diluido para evaluar la eficacia de la etapa de pretratamiento. *II Jornadas de Investigación En Ingeniería Del NEA Y Países Limítrofes*, 5.
- Diaz, J., & Herrera, F. (2002). Producción de etanol combustible a partir de lignocelulosas. Retrieved from www.unicauca.edu.co/ai/publicaciones/Fiet_40_Jaime.pdf
- Eggeman, T., & Elander, R. T. (2005). Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresource technology*, 96(18), 2019-2025.

- Fengel, D., & Wegener, G. (1984). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter, 613, 1960-82.
- Garrett, R. H., & Grisham, C. M. (1996). *Part I: Molecular components of cells. Biochemistry* 3rd edn. Harcourt Brace Custom Publishers, Belmont, 1-375.
- Gracia, C. (2004). Biocombustibles: ¿energía o alimento : Bioetanol, 77–103. Retrieved from www.ub.edu/ecologia/carlos.gracia/PublicacionesPDF/Capítulo_4_Bioetanol.pdf
- Hernández Santoyo, A., García Hernández, E., & Rodríguez Romero, A. (1999). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=47543418>. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=47543418>
- Juri, A. (2011). Sacarificación Y Fermentación Simultánea Para La Producción De Bioetanol De Segunda Generación, Mediante Pretratamientos Alternativos: Líquidos Iónicos Reciclados Y Hongos De Pudrición Blanca. *Memoria Para Optar El Titulo de Ingeniero Civil En Biotecnología. Universidad de Chile*, 66. Retrieved from http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2011/cf-juri_sa/pdfAmont/cf-juri_sa.pdf
- Komanoya, T., Kobayashi, H., Hara, K., Chun, W.-J., & Fukuoka, A. (2014). Kinetic Study of Catalytic Conversion of Cellulose to Sugar Alcohols under Low-Pressure Hydrogen. *ChemCatChem*, 6(1), 230–236. <https://doi.org/10.1002/cctc.201300731>
- Mateus, L., Hernández, O., Velásquez, M., & Díaz, J. D. J. (2012). Evaluación del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido del pasto maralfalfa (*Pennisetum glaucum* x *Pennisetum purpureum*) para la producción de etanol. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 146-156.
- Medina-Morales, M. A., Lara-Fernández, L., Aguilar, C. N., & de la Garza-Toledo, H. (2011). Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol como carburante. *Acta Química Mexicana*, 3(6), 35–41. Retrieved from http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM6/Art_4.pdf
- Mitsuzawa, S., Kagawa, H., Li, Y.L., Chan, S.L., Paavola, C. and Trent, J., The rosettazyme: A synthetic cellulosome. *Journal of Biotechnology*, 143, pp. 139-144, 2009.
- Morales, S. (2015). Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos, 21–26. Retrieved from http://digital.csic.es/bitstream/10261/132717/1/morales_de_la_rosa_silvia.pdf
- Moreno, J., & Peinado, R. (2012). *Chemistry Enologica*. (E. Inc, Ed.) (Firts Edit). San Diego,

CA, USA: Copyright _ 2012. Retrieved from www.elsevierdirect.com/rights
for further information

- Olivera, Y., Machado, R., Del Pozo, P. . 5p. P. y forrajes. (2005). Matanzas-Cuba. Características botánicas y agronómicas de especies forrajeras importantes del género *Brachiaria*. Estación experimental de pastos y forrajes “Induo Hatuey”. In *Sistemas Inteligentes para Domicilios y edificios*. (Vol. 29, N, p. 10). Retrieved from <http://es.slideshare.net/Andysebas1/domotica-42887798>
- Olofsson, K., Bertilsson, M., & Lidén, G. (2008). A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, 1(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-1-7>
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications*. (L. John Wiley & Sons, Ed.), *Handbook of Enology* (2nd Editio, Vol. 2). West Sussex PO19 8SQ, England. <https://doi.org/10.1002/0470010398>
- Salinas, S. (2012). República del Ecuador universidad estatal de milagro (p. 137).
- Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., & Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37(1), 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045>
- Soares, I. B., Marques, O. M., Benachour, M., & de Abreu, C. A. M. (2011). Ethanol production by enzymatic hydrolysis of elephant grass. *Journal of Life Science*, 5, 157-161.
- Sousa, R., Carvalho, M. L., Giordano, R. L. C., & Giordano, R. C. (2011). Recent trends in the modeling of cellulose hydrolysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(4), 545–564. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322011000400001>
- Tejeda, L., Quintana, J., Pérez, J., & Young, H. (2011). Obtención De Etanol a Partir De Residuos De Poda, Mediante Hidrólisis Ácida E Hidrólisis Enzimática. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14(1), 111–116.
- Viñals-Verde, M., Bell-García, A., Michelena-Álvarez, G., & Ramil-Mesa, M. (2012). Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 46(1), 7-16