



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

**EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE ETANOL OBTENIDO A PARTIR DE LA HIDRÓLISIS
ÁCIDA DE LA CÁSCARA DE TRES DIFERENTES FRUTOS CÍTRICOS MEDIANTE
FERMENTACIÓN A NIVEL LABORATORIO**

Luis Haggeo Us García

Asesorado por el Ing. César Ariel Villela Rodas

Guatemala, julio de 2020

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE ETANOL OBTENIDO A PARTIR DE LA HIDRÓLISIS
ÁCIDA DE LA CÁSCARA DE TRES DIFERENTES FRUTOS CÍTRICOS MEDIANTE
FERMENTACIÓN A NIVEL LABORATORIO**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA
POR

LUIS HAGGEO US GARCÍA

ASESORADO POR EL ING. CÉSAR ARIEL VILLELA RODAS

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO

GUATEMALA, JULIO DE 2020

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANA	Inga. Aurelia Anabela Cordova Estrada
VOCAL I	Ing. José Francisco Gómez Rivera
VOCAL II	Ing. Mario Renato Escobedo Martínez
VOCAL III	Ing. José Milton de León Bran
VOCAL IV	Br. Christian Moisés de la Cruz Leal
VOCAL V	Br. Kevin Armando Cruz Lorente
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANA	Inga. Aurelia Anabela Cordova Estrada
EXAMINADOR	Ing. Víctor Manuel Monzón Valdez
EXAMINADOR	Ing. Jorge Rodolfo García Carrera
EXAMINADOR	Ing. Jorge Emilio Godínez Lemus
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE ETANOL OBTENIDO A PARTIR DE LA HIDRÓLISIS ÁCIDA DE LA CÁSCARA DE TRES DIFERENTES FRUTOS CÍTRICOS MEDIANTE FERMENTACIÓN A NIVEL LABORATORIO

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha 1 de agosto de 2018.

Luis Haggeo Us García

Guatemala 10 de octubre de 2019

Ingeniero
Williams Guillermo Álvarez Mejía
DIRECTOR
Escuela Ingeniería Química
Presente.

Estimado Ingeniero Álvarez:

Le saludo cordialmente, deseándole éxitos en sus actividades. Por medio de la presente hago constar que he revisado y aprobado el Informe Final del trabajo de graduación titulado: "EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE ETANOL OBTENIDO A PARTIR DE LA HIDRÓLISIS ÁCIDA DE LA CÁSCARA DE TRES DIFERENTES FRUTOS CÍTRICOS MEDIANTE FERMENTACIÓN A NIVEL LABORATORIO", elaborado por el estudiante de la carrera de Ingeniería Química, Luis Haggeo Us García, quien se identifica con el registro académico 2014-04267 y con el CUI 2723 69616 01 01.

Agradeciendo la atención a la presente, me suscribo de usted,

Atentamente,


Ing. César Ariel Villala Rodas

ASESOR

Ingeniero Químico Ing.

Colegiado activo no. 1175


INGENIERO QUIMICO
Colegiado No. 1.175



Guatemala, 27 de enero de 2020.
Ref. EIQ.TG-IF.006.2020.

Ingeniero
Williams Guillermo Álvarez Mejía
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Álvarez:

Como consta en el registro de evaluación, correlativo **025-2018**, le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

INFORME FINAL

Solicitado por el estudiante universitario: **Luis Haggeo Us García**.
Identificado con número de carné: **2723696160101**.
Identificado con registro académico: **201404267**.
Previo a optar al título de la carrera: **Ingeniería Química**.
En la modalidad: **Informe Final, Seminario de Investigación**.

Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

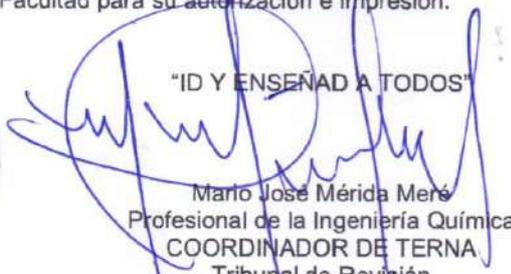
**EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE ETANOL OBTENIDO A PARTIR DE LA
HIDRÓLISIS ÁCIDA DE LA CÁSCARA DE TRES DIFERENTES FRUTOS CÍTRICOS
MEDIANTE FERMENTACIÓN A NIVEL LABORATORIO**

El Trabajo de Graduación ha sido asesorado por:

César Ariel Villela Rodas, profesional de la Ingeniería Química

Habiendo encontrado el referido trabajo de graduación **SATISFACTORIO**, se autoriza al estudiante, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a las normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.



"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

Mario José Mérida Meré
Profesional de la Ingeniería Química
COORDINADOR DE TERNA
Tribunal de Revisión
Trabajo de Graduación



C.c.: archivo



USAC
TRICENTENARIA
Universidad de San Carlos de Guatemala

FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

Edificio T-5, Ciudad Universitaria, Zona 12, Guatemala, Centroamérica
EIQD-REG-SG-007

Guatemala, 11 de agosto de 2020.

Ref. EIQ.217.2020

Aprobación del informe final del trabajo de graduación

Ingeniera
Aurelia Anabela Cordova Estrada
Decana
Facultad de Ingeniería
Universidad de San Carlos de Guatemala

Revisado el INFORME FINAL DEL TRABAJO DE GRADUACIÓN (TESIS), DENOMINADO **EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE ETANOL OBTENIDO A PARTIR DE LA HIDRÓLISIS ÁCIDA DE LA CÁSCARA DE TRES DIFERENTES FRUTOS CÍTRICOS MEDIANTE FERMENTACIÓN A NIVEL LABORATORIO** del(la) estudiante Luis Haggeo Us García, se conceptúa que el documento presentado, reúne todas las condiciones de calidad en materia administrativa y académica (rigor, pertinencia, secuencia y coherencia metodológica), por lo tanto, se procede a la autorización del mismo, para que el(la) estudiante pueda optar al título de Ingeniería Química.

"Id y Enseñad a Todos"

Ing. Williams G. Alvarez Mejía, M.I.Q., M.
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química



Cc. Archivo
WGAM/wgam



ACAAI

Asociación Centroamericana de Acreditación de
Programas de Ingeniería y Arquitectura



Formando Ingenieros Químicos en Guatemala desde 1939



**NO SALGAS
QUÉDATE EN
CASA**



DTG. 200.2020.

La Decana de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al Trabajo de Graduación titulado: **EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE ETANOL OBTENIDO A PARTIR DE LA HIDRÓLISIS ÁCIDA DE LA CÁSCARA DE TRES DIFERENTES FRUTOS CÍTRICOS MEDIANTE FERMENTACIÓN A NIVEL LABORATORIO**, presentado por el estudiante universitario: **Luis Haggeo Us García**, y después de haber culminado las revisiones previas bajo la responsabilidad de las instancias correspondientes, autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE:

Inga. Anabela Cordova Estrada
Decana

Guatemala, septiembre de 2020

AACE/asga

ACTO QUE DEDICO A:

Dios Por su gran amor y misericordia en cada momento de vida y por haberme permitido llegar hasta aquí.

Mis padres Por ser mi guía y fuente de motivación para superarme en todo momento, y por brindarme su amor y apoyo incondicional.

Mis hermanos Por su apoyo y cariño incondicional en todo momento.

.

AGRADECIMIENTOS A:

Dios	Por tenerme paciencia, por brindarme su ayuda y amor a lo largo de la carrera.
Universidad de San Carlos de Guatemala	Por ser una importante influencia en mi carrera, y ser parte de mi vida profesional.
Facultad de Ingeniería	Por brindarme de sus conocimientos.
Mi familia	Por apoyarme incondicionalmente y permitirme alcanzar este logro.
Mi asesor	Ing. César Villela, por apoyarme y brindarme el tiempo necesario para el desarrollo del presente trabajo.
Mis amigos	Por ayudarme en el desarrollo de mi tesis, en el desarrollo de la carrera y mi vida personal.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	VII
LISTA DE SÍMBOLOS.....	XI
GLOSARIO.....	XIII
RESUMEN.....	XV
OBJETIVOS.....	XVII
Hipótesis.....	XVIII
INTRODUCCIÓN.....	XIX
1. ANTECEDENTES.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Bioetanol.....	3
2.1.1. Producción de bioetanol.....	3
2.1.2. Clasificación de materia para la obtención de bioetanol.....	5
2.1.2.1. Primera generación.....	5
2.1.2.2. Segunda generación.....	5
2.1.2.3. Tercera generación.....	5
2.2. Materiales lignocelulósicos.....	6
2.2.1. Celulosa.....	6
2.2.2. Lignina.....	7
2.2.3. Hemicelulosa.....	8
2.3. Mandarina.....	9
2.4. Naranja.....	11
2.5. Limón.....	12

2.6.	Pretratamientos en materiales lignocelulósicos	14
2.6.1.	Pretratamientos mecánicos	14
2.6.1.1.	Trituración mecánica	15
2.6.1.2.	Molienda comprimida.....	15
2.6.1.3.	Extrusión.....	15
2.6.2.	Pretratamientos térmicos.....	15
2.6.2.1.	Explosión por vapor	15
2.6.2.2.	Pirolisis	16
2.6.3.	Pretratamientos fisicoquímicos	16
2.6.3.1.	Explosión por vapor con amoníaco	16
2.6.3.2.	Percolación reciclada con amoníaco....	16
2.6.4.	Pretratamientos químicos	16
2.6.4.1.	Oxidación en medio húmedo	17
2.6.4.2.	Ozonólisis	17
2.6.4.3.	Hidrolisis ácida.....	17
2.6.4.4.	Hidrolisis básica.....	18
2.6.5.	Pretratamientos biológicos	18
2.7.	Azúcares reductores	18
2.7.1.	Prueba de Benedict	19
2.8.	Fermentación	20
2.8.1.	Factores y condiciones que afectan la fermentación.....	20
2.8.1.1.	Temperatura	21
2.8.1.2.	pH.....	21
2.8.1.3.	Nutrientes	21
2.8.1.4.	Aireación.....	21
2.9.	Levadura	22
2.9.1.	Comportamiento del crecimiento de la levadura	22
2.10.	Levadura de cerveza (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	23

2.11.	Destilación	24
2.11.1.	Destilación flash o de equilibrio	25
2.11.2.	Destilación simple por lotes o diferencial.....	25
2.11.3.	Destilación simple con arrastre de vapor.....	25
2.12.	Cromatografía.....	25
3.	DISEÑO METODOLÓGICO	27
3.1.	Variables	27
3.1.1.	Variables dependientes.....	27
3.1.2.	Variables independientes.....	27
3.2.	Delimitación del campo de estudio	27
3.3.	Recursos humanos disponibles	28
3.4.	Recursos materiales disponibles	28
3.4.1.	Equipo	28
3.4.1.1.	Medición.....	28
3.4.1.2.	Auxiliar	28
3.4.2.	Cristalería	29
3.4.2.1.	Instrumentos de medición	29
3.4.2.2.	Auxiliar	29
3.4.3.	Reactivos y materia prima.....	30
3.4.3.1.	Materia prima	30
3.4.3.2.	Reactivos	30
3.5.	Técnica cuantitativa o cualitativa	30
3.5.1.	Hidrólisis alcalina	31
3.5.2.	Hidrólisis ácida.....	31
3.5.3.	Eliminación de compuestos inhibidores de la fermentación	31
3.5.4.	Destilación y cromatografía de gases FID.....	31
3.6.	Recolección, ordenamiento y procesado de la información	32

3.7.	Análisis estadístico.....	38
3.7.1.	Diseño experimental.....	38
3.7.2.	Media aritmética	38
3.7.3.	Desviación estándar	38
3.7.4.	Varianza	39
3.7.5.	Número de repeticiones recomendadas	39
3.7.6.	Análisis de varianza.....	40
3.7.7.	Prueba de Tukey	40
3.8.	Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información	41
3.8.1.	Número de repeticiones recomendadas	46
3.8.2.	Programas por utilizar para el análisis de datos	47
3.8.2.1.	Microsoft Word 2016.....	47
3.8.2.2.	Microsoft Excel 2016	47
4.	RESULTADOS	49
4.1.	Identificación de azúcares reductores	49
4.2.	Concentración de etanol en cada sustrato	49
4.3.	Rendimiento de etanol obtenido en cada sustrato	50
4.4.	Diferencia significativa del rendimiento de etanol obtenido de cada sustrato.....	52
5.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	53
5.1.	Identificación de azúcares reductores	53
5.2.	Concentración de etanol	55
5.3.	Rendimiento de etanol	57
5.4.	Diferencia significativa del rendimiento de etanol	59

CONCLUSIONES	61
BIBLIOGRAFÍA.....	65
APÉNDICES.....	69
ANEXOS	77

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1.	Estructura de la celulosa	7
2.	Precusores de la estructura de la lignina	8
3.	Estructura de la hemicelulosa	9
4.	Cultivo de mandarina en Guatemala	10
5.	Cultivo de naranja en Guatemala	12
6.	Cultivo de limón en Guatemala	14
7.	Reacción de la prueba de Benedict.....	19
8.	Fases de la levadura	23
9.	Distribución de Fisher del rendimiento porcentual de etanol obtenido de la cáscara de mandarina	43
10.	Distribución de Fisher del rendimiento porcentual de etanol obtenido de la cáscara de naranja	44
11.	Distribución de Fisher del rendimiento porcentual de etanol obtenido de la cáscara de limón	45
12.	Porcentaje de rendimiento promedio de etanol obtenido en cada sustrato en función del tiempo de hidrólisis ácida.....	51

TABLAS

I.	Caracterización de la cáscara de mandarina.....	10
II.	Caracterización de la cáscara de naranja.....	11
III.	Caracterización de la cáscara de limón	13

IV.	Volumen de ácido y base utilizado para la eliminación de compuestos inhibidores luego de la hidrólisis ácida de 2 horas	32
V.	Volumen de ácido y base utilizado para la eliminación de compuestos inhibidores luego de la hidrólisis ácida de 4 horas	33
VI.	pH de jarabe glucosado obtenido de la hidrólisis ácida de 2 horas	34
VII.	pH de jarabe glucosado obtenido en la hidrólisis ácida de 4 horas	34
VIII.	Prueba de Benedict en los hidrolizados de la cáscara de cada sustrato.....	35
IX.	Volumen de destilado obtenido de cada sustrato.....	36
X.	Porcentaje v/v (mL etanol / mL solución) de etanol obtenido de cada sustrato mediante cromatografía de gases FID	37
XI.	Prueba ANOVA.....	40
XII.	Análisis del porcentaje v/v (mL etanol / mL solución) de etanol obtenido de la cáscara de cada sustrato mediante cromatografía de gases FID ...	42
XIII.	Análisis del rendimiento porcentual de etanol obtenido de la cáscara de cada sustrato	42
XIV.	Anova del rendimiento porcentual de etanol obtenido de la cáscara de mandarina.....	43
XV.	Anova del rendimiento porcentual de etanol obtenido de la cáscara de naranja	43
XVI.	Anova del rendimiento porcentual de etanol obtenido de la cáscara de limón.....	44
XVII.	Resumen de resultados de análisis ANOVA.....	46
XVIII.	Prueba de Benedict en los hidrolizados de la cáscara de cada sustrato.....	49
XIX.	Concentración de etanol obtenido de la cáscara de cada sustrato mediante cromatografía de gases FID	50
XX.	Porcentaje de rendimiento etanol obtenido en cada sustrato en función del tiempo de hidrólisis ácida.....	51

XXI. Resultados de análisis ANOVA del porcentaje de rendimiento etanol
obtenido en cada sustrato en función del tiempo de hidrólisis ácida.....52

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
R^2	Coefficiente de correlación
ρ	Densidad (g/mL)
σ	Desviación estándar
F	F de Fisher
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
g	Gramo
h	Hora
\bar{x}	Media aritmética
mg	Miligramo
mL	Mililitro
min	Minuto
%	Porcentaje
pH	Potencial de hidrógeno
σ^2	Varianza
V	Volumen (mL)

GLOSARIO

Azúcar reductor	Tipo de carbohidrato o azúcar natural que contiene un grupo aldehído o cetona libre capaz de actuar como un agente reductor y donar electrones a otra molécula.
Biocombustible	Combustible proveniente de biomasa o materia orgánica originada en un proceso biológico, utilizado como sustitutos de combustibles derivados del petróleo.
Cromatografía	Método de separación física en donde los componentes líquidos o gaseosos son separados y distribuidos en dos fases, una móvil y otra estacionaria.
Enzima	Moléculas orgánicas que actúan como catalizadores biológicos, es decir, que poseen la capacidad de aumentar la velocidad de reacción de manera considerable sin consumirse.
Extracción	Técnica de separación de sustancia en una mezcla por disolución para obtener cada componente, sirviéndose de uno o más solventes, donde usualmente se obtienen dos componentes: el extracto y el residuo.

Fermentación	Proceso metabólico anaeróbico por el cual una sustancia orgánica se transforma en otra más simple por la acción de un fermento.
Hidrólisis	Proceso químico que utiliza un agente catalizador ácido o básico que convierte disacáridos y polisacáridos en monosacáridos.
Jarabe glucosado	Líquido obtenido a partir de la hidrólisis ácida de materia lignocelulósica que generalmente contiene al solvente y monosacáridos de glucosa.
Lixiviación	Extracción de uno o varios solutos de un sólido mediante la utilización de un disolvente líquido.
Materia prima	Todo aquel elemento que se transforma e incorpora en un producto final.
pH	Medida de acidez o alcalinidad de una disolución, indicando la cantidad de iones de hidrogeno presentes.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con el fin de evaluar el rendimiento de etanol obtenido a partir de la hidrólisis ácida de la cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*), cáscara de naranja (*Citrus sinensis L.*) y cáscara de limón (*Citrus latifolia*), mediante la fermentación con levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) a escala laboratorio.

Para la realización del estudio se realizó pretratamientos físicos y químicos a la materia prima, estos fueron la disminución del tamaño de partícula e hidrólisis alcalina. Posteriormente se realizó a cada muestra de sustrato pretratada la hidrólisis ácida mediante maceración estática con reflujo, utilizando ácido sulfúrico al 4 % como solvente y variando los tiempos de extracción de 2 y 4 horas.

Luego de realizar la hidrólisis ácida, el hidrolizado de cada sustrato fue sometido a un aumento de pH y a su posterior disminución, con el fin de precipitar y eliminar agentes inhibidores. Al jarabe glucosado obtenido de cada muestra se le determinó la presencia de azúcares solubles mediante la prueba de Benedict. Finalmente, se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación alcohólica de cada sustrato, utilizando la operación unitaria de destilación para la separación del etanol en la solución y su cuantificación mediante cromatografía de gases FID (detector de ionización de llama).

Se determinó que el sustrato con mayor rendimiento de etanol fue la cáscara de naranja con un valor de $0,4423 \pm 0,0241$ % con una desviación estándar de 0,1248 %, seguido de la cáscara de mandarina con

0,3501 \pm 0,0140 % con una desviación estándar de 0,0941 % y, por último, la cáscara de limón con 0,1470 \pm 0,0044 % con una desviación estándar de 0,0283 %. Los mayores rendimientos de etanol en cada sustrato se obtuvieron al estar predispuestos a un tiempo de hidrólisis ácida de cuatro horas. Tal dependencia del rendimiento de etanol y el tiempo de extracción se confirmó mediante un análisis de varianza ANOVA.

El estudio se llevó a cabo con condiciones ambientales, en el Laboratorio de Fisicoquímica de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos.

OBJETIVOS

General

Evaluar el rendimiento de etanol obtenido a partir de la hidrólisis ácida de la cáscara de mandarina (*citrus reticulata*), limón (*citrus latifolia*) y naranja (*citrus sinensis L.*) mediante la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* a nivel laboratorio.

Específicos

1. Identificar azúcares reductores a partir de la prueba de Benedict en cada sustrato.
2. Determinar la concentración de etanol presente en cada muestra mediante cromatografía de gases FID.
3. Determinar el porcentaje de rendimiento de etanol obtenido de cada sustrato en función del tiempo de hidrólisis ácida (2 y 4 horas).
4. Evaluar la existencia de diferencia significativa del rendimiento de etanol obtenido de cada sustrato, cáscara de mandarina (*citrus reticulata*), cáscara de limón (*citrus latifolia*) y cáscara de naranja (*citrus sinensis L.*) respectivamente.

Hipótesis

Hipótesis científica

Es posible la obtención de bioetanol a partir de la cáscara de mandarina, cáscara de limón y la cáscara de naranja mediante la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

Hipótesis nula

- $(H_0)_1$: el rendimiento de bioetanol no varía significativamente en función del tiempo en la hidrólisis ácida.

Hipótesis alternativa

- $(H_0)_1$: el rendimiento de bioetanol varía significativamente en función del tiempo en la hidrólisis ácida.

INTRODUCCIÓN

El etanol o alcohol etílico obtenido mediante la fermentación de azúcares reductores es denominado como bioetanol. Comúnmente, entre sus principales fuentes de materia prima se encuentran la materia vegetal que posee en su composición fructosa, glucosa, galactosa, entre otros.

La cáscara de los frutos cítricos de naranja (*Citrus sinensis L.*), mandarina (*Citrus reticulada*) y limón (*Citrus latifolia*) presentan en su composición azúcares reductores los cuales pueden ser extraídos mediante maceración estática con reflujo utilizando como solvente ácido sulfúrico a concentraciones bajas.

El proceso de fermentación alcohólica de estos compuestos puede llevarse a cabo mediante el uso de levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*), la cual produce una sustancia alcohólica y otros subproductos como dióxido de carbono. Este proceso se encuentra influido por parámetros y condiciones tales como temperatura, pH, concentración, entre otros, que pueden afectar de manera significativa su rendimiento.

La separación del bioetanol de otros compuestos resultantes de la fermentación puede llevarse a cabo mediante una destilación simple. Esta operación unitaria consiste en aplicar calor a la mezcla hasta una temperatura superior al punto de ebullición del etanol y menor al de los otros compuestos a una presión específica.

La selección adecuada de procedimientos, métodos y condiciones para la obtención de bioetanol de este tipo de fuente de materia vegetal conlleva

conjuntamente al aprovechamiento de biomasa que generalmente se descarta como desechos o residuos agroindustriales, debido a su elevado cultivo en el territorio de Guatemala.

1. ANTECEDENTES

En la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala se realizó la tesis *Comparación de la cantidad de bioetanol obtenido a partir de la hidrólisis ácida de la cáscara de naranja (citrus sinensis L.) y la cáscara de plátano (musa paradisiaca), al realizar la variación del tamaño de partícula y el porcentaje de ácido sulfúrico durante la fermentación a nivel laboratorio*. El objetivo de la investigación fue comparar la cantidad de bioetanol obtenida entre dos tipos de frutos que son cultivados en grandes cantidades en Guatemala, en función de la variación de parámetros físicos y químicos en el proceso.

En la Universidad de Antioquia, Colombia, fue publicado el artículo: *Evaluación potencial de las cáscaras de frutas en la obtención de bioetanol*. Su meta fue evaluar frutos cítricos de la región Caribe de Colombia, tales como mandarina, naranja, entre otros; como potenciales fuentes para la obtención de bioetanol mediante fermentación alcohólica. Lo anterior con miras a contribuir a una propuesta para la utilización y disminución de desechos agroindustriales en el país.¹

La Universidad de Ehime y la compañía de Ehime Beverage Inc. de Japón, presentó el artículo científico titulado: *First Plant for Manufacturing Ethanol from Tangerine Residue Reaches Completion*. En el cual se describe el proceso y la tecnología empleada en la primera planta de manufactura que utiliza residuos de mandarina para la obtención de bioetanol dentro del país de Japón.

¹ TEJEDA, Lesly. *Evaluación del potencial de las cáscaras de frutas en la obtención de bioetanol*. p. 30.

La planta entró en funcionamiento en 2011, siendo una de las primeras en contemplar el uso de residuos a gran escala para la obtención de biocombustibles y su comercio.

En la Universidad Tecnológica Nacional de Tucumán, Argentina, se realizó la investigación de maestría en ingeniería ambiental titulada: Reducción de la carga orgánica de las aguas de lavado de cáscara de limón por fermentación con levaduras y obtención de alcohol etílico. La cual tenía como objetivo el aprovechamiento y reducción de cargas orgánicas de las aguas y cáscaras de limón utilizando fermentación producida con levaduras, obteniendo etanol y dióxido de carbono como subproductos, los cuales poseen otros usos y algún valor económico.

En la Universidad del Tolima, Colombia, la revista *Tumbaga* publicó el artículo científico titulado: “Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos” en donde se describe el proceso para la obtención de bioetanol a partir de biomasa, compuestos con materiales lignocelulósicos, primordialmente los que contienen lignocelulosa.

Se considera la importancia de los pretratamientos físicos y químicos a los cuales es sometida la materia prima previo a la fermentación con levaduras para obtener mejoras significativas en los rendimientos de etanol obtenidos en el proceso. De igual manera, enfatiza el uso de enzimas obtenidas a partir de cultivos fúngicos y bacterianos aislados en laboratorios como sustitutos en las levaduras.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Bioetanol

El etanol es un tipo de biocarburante producido por procesos biológicos de fermentación u obtenido a partir de derivados de petróleo. El etanol es considerado uno de los compuestos comercializados más utilizado mundialmente en el sector energético y de transporte.

El etanol que se produce a partir de cualquier materia prima biológica o de origen vegetal que contenga cantidades considerables de azúcar, almidón o materia lignocelulósica se denomina bioetanol.

En vista de que las materias primas son “parte fundamental del sustento humano y natural, y su disponibilidad es limitada a pesar de ser fuentes renovables y sostenibles, tanto por el exceso de demanda por parte de los países de primer mundo como por la acrecentada población, se trata de desarrollar la obtención de etanol a partir de fuentes de biomasa lignocelulósica como una solución”.²

2.1.1. Producción de bioetanol

La producción de estos compuestos se basa principalmente en la fermentación de azúcar o materia lignocelulósica por enzimas producidas a partir de una levadura. Los procesos de fermentación tradicionales consisten en

² MEDINA MORALES, Miguel; LARA FERNÁNDEZ, Lorena; *et al. Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol como carburante.* p. 35.

convertir los azúcares, como la glucosa o fructosa en etanol y otros químicos secundarios.

A nivel industrial, la producción de bioetanol se ha incrementado de manera sustancial debido a sus grandes beneficios en aspectos ambientales, proporcionando la disminución de CO₂ por el uso de combustibles derivados del petróleo, además de obtener un gran número de productos químicos secundarios con una amplia gama de usos en la industria alimenticia, farmacéutica y médica.

No obstante, el aumento del alcance de aplicación de este compuesto en diversas industrias ha comenzado a generar que la mayor fuente de materia prima para la elaboración de bioetanol sean excedentes agroindustriales que comúnmente han sido utilizados únicamente en las industrias como fuentes combustibles según su poder calorífico.

Con ello, se busca cumplir con la demanda de bioetanol y, a su vez, mantener y optimizar los recursos naturales existentes. Sin embargo, cabe mencionar que el uso de este tipo de fuentes de materia prima en muchos casos se encuentra restringido por aspectos económicos debido a que la materia prima debe llevar otros procesos como limpieza o pretratamientos.

Asimismo, es ineludible considerar que la producción de bioetanol por medio de excedentes agroindustriales proporcionará una mayor sostenibilidad ambiental, al no exponer estos desechos a espacios naturales y permitir su disminución en volumen. Conjuntamente se abarca el aprovechamiento y reutilización de materia vegetal en otro tipo de procesos que pueden generar beneficios o ventajas competitivas a la industria hoy día.

2.1.2. Clasificación de materia para la obtención de bioetanol

A continuación, se muestra la clasificación de materia para la obtención de bioetanol.

2.1.2.1. Primera generación

“Los biocombustibles que se definen como de primera generación se refieren a aquellos de cultivos básicos destinados al consumo humano como azúcares o almidones. En algunos casos es utilizada la grasa animal extraída de otros procesos”.³

2.1.2.2. Segunda generación

El bioetanol también se puede obtener a partir de sustancias que contienen lignocelulosa como es el caso de los residuos agrícolas los cuales no tiene una función alimenticia. Para producirlo, es necesario implementar diferentes etapas para tratar a la materia prima. Entre los pasos necesarios se encuentra la adición de hidrólisis lo cual permitirá romper los enlaces presentes en la celulosa y lignocelulosa, obtener el azúcar y mediante un agente biológico se realiza el proceso de fermentación para obtener el bioetanol. El último paso es la separación de este en la solución mediante destilación.

2.1.2.3. Tercera generación

Estos tipos biocombustibles son generados a partir de materia vegetal de origen marítimo en su mayor parte como lo son las microalgas. El alga prolifera rápidamente y utiliza de manera eficiente la radiación solar, CO₂ y elementos

³ ALARCÓN, Aurea. *Producción de bioetanol con Zymomonas móviles*. p. 58.

inorgánicos. Siendo una de las fuentes más novedosas para producir bioetanol se ha acrecentado el estudio de la modificación genética de algas para lograr un mayor rendimiento.

2.2. Materiales lignocelulósicos

La biomasa lignocelulósica es un tipo de materia constituida principalmente por ciertos tipos de proteínas, carbohidratos, celulosa, hemicelulosa y lignina. Se denominan como un heteropolímero de alto complejo y el componente estructural de las plantas. Estas se pueden obtener de biomasa proveniente de zonas de condiciones climáticas cálidas o áridas.

“El almacenamiento de una cantidad fija de energía en partes de sus componentes, hacen de la lignocelulosa un compuesto altamente biotecnológico. La lignina, celulosa, y hemicelulosa forman estructuras llamadas microfibrillas, las cuales tiene la función de regular la estabilidad de la pared celular en las plantas”.⁴

2.2.1. Celulosa

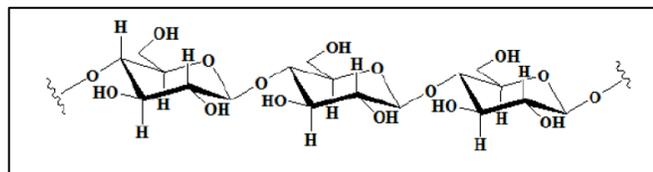
La celulosa es un compuesto considerado como un biopolímero ya que forma parte de estructuras biológicas vegetales. La celulosa es polímero lineal cuya unidad estructural es la celobiosa, formada por residuos de Dglucopiranosas unidas mediante un enlace β (1 \rightarrow 4).

Como en todo polímero su estructura es altamente cristalina debido a la presencia de puentes de hidrógeno ínter e intramoleculares que influyen en su

⁴ MEDINA MORALES, Miguel; LARA FERNÁNDEZ, Lorena; *et al.* *Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol como carburante*. P. 30.

morfología y en otros parámetros de importancia. Las zonas de alta cristalinidad son difíciles de hidrolizar en sus unidades monoméricas, mientras que las zonas de menor cristalinidad, es decir amorfas, son accesibles y susceptibles a las reacciones químicas. En la figura, se representan la estructura de la celulosa:

Figura 1. **Estructura de la celulosa**



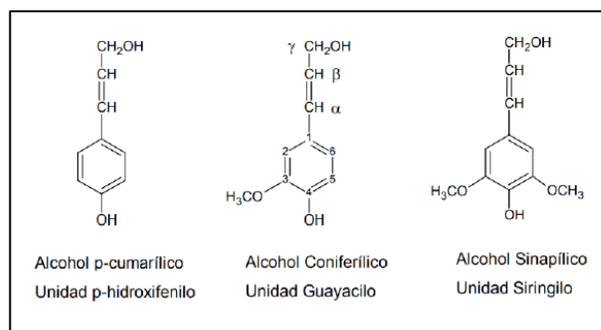
Fuente: SELA, Andrés. *Hidrolisis de residuos lignocelulósicos procedente del comercio de frutas y hortalizas como paso previo a la producción de bioetanol*. p. 18.

2.2.2. **Lignina**

La lignina es un heteropolímero no carbohidrato de características amorfo, tridimensional y ramificado, formado por alcoholes aromáticos que da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y es altamente resistente a la degradación química y biológica.

Puede retirarse mediante métodos y distinto pretratamientos con la finalidad de romper matrices y así llegar al material lignocelulósico. En la figura, se presentan los principales componentes estructurales de la lignina.

Figura 2. Precursores de la estructura de la lignina



Fuente: SELA, Andrés. *Hidrolisis de residuos lignocelulósicos procedente del comercio de frutas y hortalizas como paso previo a la producción de bioetanol*. p. 19.

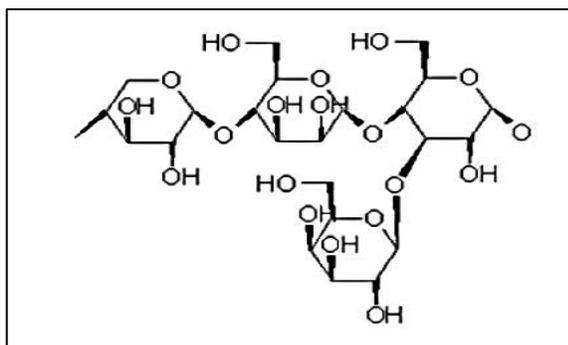
2.2.3. Hemicelulosa

La hemicelulosa es una estructura compleja de carbohidratos que consiste en diferentes polímeros, tales como: pentosas, hexosas (glucosa, mañosa y galactosa) y ácidos urónicos. La xilana, cadena principal de este compuesto, está constituida por residuos de β-xilopiranosos unidos mediante un enlace β (1→4). Al tener una configuración estructural amorfa y muy hidrofílica, permite que sea mayor su obtención y sea fácil de hidrolizar, incluso mejor que en el caso de la celulosa.⁵

La principal diferencia entre hemicelulosa y la celulosa es el tamaño de la molécula, debido a que la hemicelulosa se compone de glucosa y otros tipos de azúcares. Sin embargo, las cadenas poliméricas individuales de estos compuestos contienen aproximadamente de 50 a 90 unidades monoméricas de azúcares. Debido a que las cadenas de hemicelulosa no son lineales, poseen en su estructura ramificaciones laterales y haciéndolas irregulares y, por ende, este polímero no es cristalino y es fácilmente hidrolizado.

⁵ SELA, Andrés. *Hidrolisis de residuos lignocelulósicos procedente del comercio de frutas y hortalizas como paso previo a la producción de bioetanol*. p. 25.

Figura 3. Estructura de la hemicelulosa



Fuente: SELA, Andrés. *Hidrolisis de residuos lignocelulósicos procedente del comercio de frutas y hortalizas como paso previo a la producción de bioetanol*. p. 20.

2.3. Mandarina

La mandarina, llamada también en algunos casos con el nombre de tangerina. Crece en las regiones tropicales, donde la calidad el fruto es muy variable, dependiendo de los microclimas y de la altitud. La producción de este fruto es comúnmente continua a lo largo del año y es destinada al mercado en fresco.

La cáscara de la mandarina (*citrus reticulata*), presenta diversas propiedades de compuestos que pueden ser aprovechables. La composición química de la cáscara de esta se muestra en la siguiente tabla:

Tabla I. **Caracterización de la cáscara de mandarina**

Parámetro	Valor (%)
Grasas	1,6
Celulosa	22,5
Hemicelulosa	60,0
Lignina	8,6
Pectina	16,0
Azúcares reductores	10,1

Fuente: elaboración propia.

En Guatemala, el cultivo de mandarina está presente en los huertos familiares “más que como cultivo formal, por lo que existe una demanda insatisfecha que es cubierta con importaciones de otros países en el orden de las 204 toneladas por año. Las cuales van en ascenso. Con la incorporación de este cultivo en las zonas cafetaleras puede cubrirse la demanda y ofertar al mercado internacional los remanentes del producto”.⁶

Figura 4. **Cultivo de mandarina en Guatemala**



Fuente: Anacafé. *Cultivo de mandarina*.
http://anacafe.org/glifos/index.php?title=Cultivo_de_mandarina. Consulta: 15 de abril 2019.

⁶ Anacafé. *Cultivo de mandarina*. http://anacafe.org/glifos/index.php?title=Cultivo_de_mandarina.

2.4. Naranja

La naranja es una especie subtropical. Su factor limitante más importante es la temperatura, dado que al llegar a temperaturas inferiores a -2 °C ya no es tolerable. Tanto las flores y frutos como la vegetación pueden desaparecer totalmente por dichas condiciones. Presenta una parada del crecimiento debido a bajas temperaturas. Necesita temperaturas cálidas durante el verano para la correcta maduración de los frutos.

“El fruto tiene una forma más o menos globosa y mide de 6,4 a 9 centímetros de diámetro, la corteza es poco rugosa, adherente, de color anaranjado. Las semillas, escasas, si hay alguna, tienen color blanco y la testa rugosa”.⁷

La composición química de la cáscara de la naranja (*Citrus sinensis* L.) presenta la información básica de azúcares y compuestos que la misma posee, variando de acuerdo con el tipo de disposición de esta.

Tabla II. **Caracterización de la cáscara de naranja**

Parámetro	Valor [%]
Grasa	4,0
Celulosa	37,1
Hemicelulosa	11,0
Lignina	7,5
Pectina	23,0
Azúcares reductores	9,6

Fuente: elaboración propia.

⁷ Anacafé. *Cultivo de mandarina*. http://anacafe.org/glifos/index.php?title=Cultivo_de_mandarina.

Según los reportes de comercio exterior Guatemala importa naranjas frescas de Honduras en un rango de 11 000 a 13 000 TM. Lo cual indica que existe un déficit para cubrir la demanda nacional y la oportunidad de crecer en áreas de producción para dicho producto. Sin embargo, Guatemala cuenta con una gran diversidad de especies y familias de este fruto en diferentes regiones, lo que la hace muy consumida por las comunidades.

Figura 5. **Cultivo de naranja en Guatemala**



Fuente: Anacafé. *Cultivo de naranja*.
http://anacafe.org/glifos/index.php?title=Cultivo_de_naranja. Consulta 15 de abril de 2019.

2.5. **Limón**

“Los limones están clasificados como frutas cítricas ácidas que difieren de las otras variedades de cítricos en cuanto a que típicamente se utilizan para otros fines debido a su sabor. El limón es una especie que se produce generalmente

en climas cambiantes (estaciones frías y cálidas). El limón es sumamente sensible al clima frío y crece exclusivamente en climas tropicales”.⁸

La cáscara de limón es fuente de diversos compuestos que resultan beneficiosos para el ser humano. Además de presentar compuestos que pueden ser de alguna utilidad industrial.

Tabla III. **Caracterización de la cáscara de limón**

Parámetro	Valor [%]
Grasa	1,5
Celulosa	23,1
Hemicelulosa	8,1
Lignina	7,6
Pectina	13,0
Azúcares reductores	7,0

Fuente: elaboración propia.

La comercialización del fruto es llevada a cabo por el tamaño, para esto se manejan dos diámetros transversales, se considera fruto grande aquel que rebase un diámetro transversal de 5,3 cm. es dirigido principalmente a mercado nacional (supermercados) y pequeño es el fruto que tiene un diámetro alrededor de 4,8 cm. destinado a mercado local y a pequeños distribuidores.

⁸ MARÍN, Francisco; SOLER, Cristina; BENAVENTE-GARCÍA, Obdulio; CASTILLO, Julian, PÉREZ-ÁLVAREZ, José. *Byproducts from different citrus processes as a source of customized functional fibres*. p. 78.

Figura 6. **Cultivo de limón en Guatemala**



Fuente: Anacafé. *Cultivo de naranja*.
http://anacafe.org/glifos/index.php?title=Cultivo_de_naranja. Consulta 16 de abril de 2019.

2.6. Pretratamientos en materiales lignocelulósicos

En esta etapa del proceso, los pretratamientos en materia lignocelulósica se realizan con el objetivo de la reducción de la cristalinidad de la celulosa, además de disociar los complejos lignina-celulosa, aumentar el área superficial del material utilizado, minimizar la presencia de agentes que pueden dificultar etapas posteriores a esta, entre otros. Se cuenta con diversos tipos de tratamiento a los cuales puede ser sometido la materia prima, entre los cuales se destacan los siguientes:

2.6.1. Pretratamientos mecánicos

A continuación, se presentan los pretratamientos mecánicos.

2.6.1.1. Trituración mecánica

Tipo de molienda que reduce la cristalinidad de la celulosa, aumentando la superficie específica y la densidad aparente, facilitando la etapa de hidrolisis. Presenta el inconveniente de un alto consumo energético, dependiendo del tamaño de partícula deseada y la cantidad de esta. Generalmente se recomienda el uso de tamices en este método.

2.6.1.2. Molienda comprimida

Este método se considera como un tipo molienda con un dispositivo sometido a una sobrepresión. Obteniendo un material más homogéneo en comparación a otros métodos.

2.6.1.3. Extrusión

Consiste en calentar la biomasa, mezclarla y cortarla produciendo cambios químicos y físicos en el material cuando pasa por la extrusora.

2.6.2. Pretratamientos térmicos

A continuación, se muestran los pretratamientos térmicos.

2.6.2.1. Explosión por vapor

“Consiste en combinar altas temperaturas, entre 180 y 240 °C, y presiones seguida de una brusca descompresión, provocando disgregación y una ruptura en las fibras de la muestra”.⁹

⁹ MARTÍNEZ-ALCALÁ, Ángeles. *Producción de bioetanol: mejora del proceso a partir de grano de cereal y de biomasa lignocelulósica tratada con steam explosion*. p. 50.

2.6.2.2. Pirolisis

Con este método se logra una descomposición eficiente de la materia bajo la presencia de calor y en ausencia de medios oxidantes. Comúnmente se realiza entre un rango de temperatura de 300 a 1 000 °C.

2.6.3. Pretratamientos fisicoquímicos

A continuación, se muestran los pretratamientos fisicoquímicos.

2.6.3.1. Explosión por vapor con amoniaco

Análogo al proceso de explosión con vapor, consiste en que la biomasa es impregnada con amoniaco líquido, aproximadamente por 30 minutos y una temperatura controlada de 90 °C. Modifica las características estructurales de la lignina facilitando el acceso a enzimas de interés.

2.6.3.2. Percolación reciclada con amoniaco

Se utiliza una solución de amoniaco entre el 10 y 15 % de concentración en agua destilada, la cual se hace pasar a través de la biomasa a temperaturas elevadas cercanas a los 150 y 180 °C.

2.6.4. Pretratamientos químicos

A continuación, se muestran los pretratamientos químicos.

2.6.4.1. Oxidación en medio húmedo

Consiste en someter a la biomasa a la acción de agua a temperaturas mayores a 150 °C en presencia de oxígeno. Permitiendo la solubilización de hemicelulosas en mejores cantidades en comparación con otros métodos.

2.6.4.2. Ozonólisis

El ozono actúa como un agente deslignificador, provocando que la hemicelulosa sea atacada levemente y que la celulosa se mantenga intacta en el proceso. La ventaja de este pretratamiento es que no genera sustancias tóxicas y se elimina fácilmente.

2.6.4.3. Hidrolisis ácida

Los ácidos como el ácido sulfúrico y ácido clorhídrico concentrados son poderosos agentes que hidrolizan la celulosa, pero son altamente corrosivos y peligrosos por lo que requieren equipos adecuados a la corrosión.

Este tipo de pretratamiento se lleva a cabo comúnmente con ácido sulfúrico diluido, con concentraciones del 1 al 4 % y en relación con la biomasa lignocelulósica. Las temperaturas y los tiempos son comúnmente parámetros de investigación. La función principal es aumentar la superficie de la celulosa accesible a los enzimas, gracias a la extracción de la fracción hemicelulósica. Considerando que se tienen pocos efectos sobre el grado de cristalinidad de la celulosa en la biomasa.

2.6.4.4. Hidrolisis básica

Los pretratamientos de este tipo son realizados mediante el uso de álcalis como hidróxido de sodio y calcio. Estos eliminan y alteran la estructura de la lignina, aumentando la accesibilidad enzimática a la celulosa y aumentando el tamaño del poro permitiendo una mejor difusión en el proceso. Se lleva cabo con una base al 8-12 % en peso durante 20 a 60 minutos. “Sin embargo, existen pérdidas variables de material lignocelulósico en la muestra según el caso”.¹⁰

2.6.5. Pretratamientos biológicos

Considera la acción de microorganismos con el objetivo de generar actividades enzimáticas capaces de hidrolizar los polímeros dentro de muestras de investigación. Los microorganismos más utilizados son los hongos producidos a partir de la podredumbre en la biomasa.¹¹

2.7. Azúcares reductores

Un azúcar reductor se define como aquel que posee un grupo aldehído, cetona o carbonilo que se puede reducir, si carece de alguno de ellos es considerado un azúcar no reductor. Estos poseen el grupo carbonilo, y que a través de este pueden reaccionar como reductores con otras moléculas. Estos tipos de azúcares son oxidados mediante agentes oxidantes débiles provenientes de las pruebas de Fehling o Benedict. Esta reacción permite que los azúcares puedan revertir su forma de cadena abierta.

¹⁰ SELA, Andrés. *Hidrolisis de residuos lignocelulósicos procedente del comercio de frutas y hortalizas como paso previo a la producción de bioetanol*. P.49.

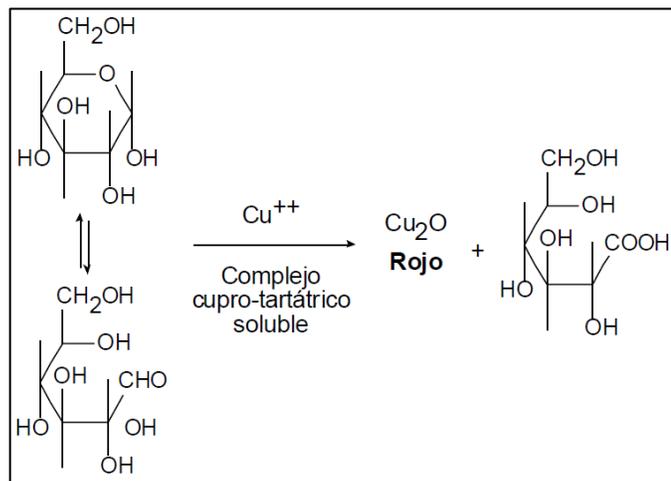
¹¹ MADIGAN, Mishel; MARTINKO, John. *Biología de los microorganismos*. p. 72.

2.7.1. Prueba de Benedict

“Esta prueba se caracteriza por el reconocimiento de azúcares reductores. La reducción que existe en los azúcares se debe al grupo carbonilo, que puede ser oxidado a grupo carboxilo con agentes oxidantes suaves. Cuando el grupo carbonilo esté combinado, no se presenta ningún tipo de actividad reductor”.¹²

Los azúcares reductores son capaces de reducir el ion Cu^{2+} de color azul a Cu^+ de color rojo en medios básicos. El grupo carbonilo del azúcar pasa a ser un grupo carboxilo cuando este se oxida. Al utilizar una base se crea un medio básico y el ion Cu^{2+} forma el compuesto Cu_2O que es insoluble. Una forma de evitar tal inconveniente es añadir citrato de sodio que actúa como un agente estabilizador.

Figura 7. Reacción de la prueba de Benedict



Fuente: NELSON, D. L. Lehninger: *Principios de bioquímica*. p. 35.

¹² MILLER, Lorenz. *Use of Dinitrosalicilic acid reagent for determination of sugar reducing*. p. 20.

2.8. Fermentación

La fermentación es un proceso que transforma las moléculas de azúcar en distintos productos que depende del sustrato y del tipo de bacteria o microorganismo que se utilice. Un tipo particular de esta es la fermentación alcohólica que consiste en un proceso anaeróbico realizado por levaduras o bacterias. Obteniendo como su nombre lo indica una sustancia alcohólica y otros subproductos como dióxido de carbono.

Los principales compuestos para completar la reacción son las hexosas denominados como monosacáridos formados por una cadena de seis átomos de carbono. La naturaleza de estos compuestos permite la obtención de alcohol etílico. El balance global del proceso de fermentación alcohólica para un azúcar reductor o hexosa es el siguiente:



“En el balance se destaca la formación de otros compuestos ATP en la reacción. Sin embargo, la formación de estos compuestos en su mayor parte es diminuta en comparación con la cantidad de azúcares transformados en alcohol etílico y dióxido de carbono. Entre las sustancias secundarias se encuentran: glicerol, ácidos orgánicos, esterres, entre otros”.¹³

2.8.1. Factores y condiciones que afectan la fermentación

A continuación, se muestran los factores y condiciones que afectan la fermentación.

¹³ ACOSTA ROMERO, Carolina. *Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel*. p. 43.

2.8.1.1. Temperatura

Los microorganismos en cualquier proceso de reacción mantienen un rango de temperaturas específicos que permiten su existencia y crecimiento. En un proceso de fermentación es indispensable establecer un rango de temperatura adecuado para la viabilidad de este.

2.8.1.2. pH

“De manera similar que la temperatura, el pH es un factor limitante en el sistema. Generalmente al tratar con microorganismos debe coexistir un rango adecuado de pH entre 3,5 y no mayor a 6 (un medio ácido) que induzca el crecimiento óptimo de la levadura durante la reacción. Una variación en el pH puede afectar el rendimiento de los productos obtenidos”.¹⁴

2.8.1.3. Nutrientes

La presencia de nutrientes en el medio de cultivo proporciona los elementos esenciales para el rendimiento y crecimiento óptimo de los microorganismos.

2.8.1.4. Aireación

La exclusión de oxígeno en el proceso de fermentación generalmente se caracteriza por favorecer la producción de bioetanol y no de biomasa y material celular.

¹⁴ ACOSTA ROMERO, Carolina. *Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel*. p. 43

2.9. Levadura

Las levaduras son los diversos hongos microscópicos y microorganismos con la capacidad de descomponer sustratos mediante fermentación. Se caracterizan por su uso mayor en las industrias licoreras, debido a la producción de etanol.

En la fermentación alcohólica los microorganismos más importantes y utilizados son las levaduras de los géneros *Candida seudotropicalis* y *Saccharomyccx cerevisiae* que además de presentar los mejores rendimientos, poseen las ventajas de desempeñarse en diversas condiciones controladas.

“La obtención de alcohol etílico y cuerpos orgánicos a partir de azúcares reductores es una cualidad de algunos tipos especiales de levaduras y organismos”.¹⁵

2.9.1. Comportamiento del crecimiento de la levadura

La curva de crecimiento de la levadura en función del tiempo muestra el comportamiento de los microorganismos en la fermentación. Se establecen cuatro fases básicas por la cual atraviesa el sistema.

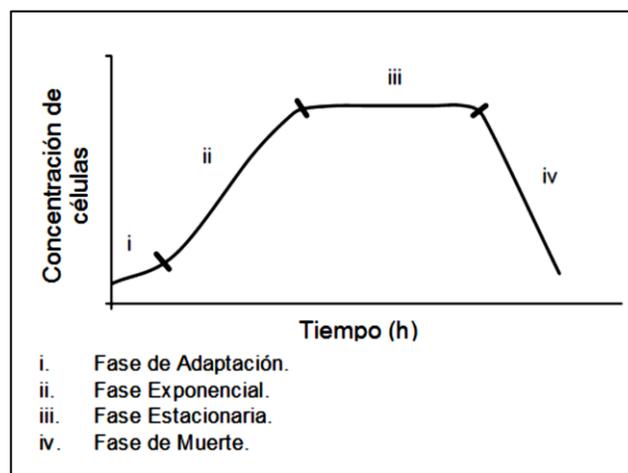
La primera fase es la de adaptación, en esta los microorganismos buscan adaptarse a los elementos y condiciones que presenta el sistema. El crecimiento es leve comparado con la fase posterior. La segunda fase corresponde al crecimiento exponencial, la concentración de microorganismos se eleva de

¹⁵ REYES, Luis. *Producción de etanol por fermentación de suero de quesería con levaduras del género Kluyveromyces y Saccharomyces*. p. 67.

manera considerable hasta un valor máximo. Al alcanzar el consumo límite de elementos y recursos en el sistema las condiciones del sistema cambian.

“La tercera fase consiste en la concentración constante de los microorganismos, debido al agotamiento de nutrientes en el medio las células empezaran a morir. Finalmente, el sistema llegará a la fase de muerte, donde sucesivamente habrá una cantidad menor de células hasta que no se encuentre ninguna”.¹⁶

Figura 8. Fases de la levadura



Fuente: SÁNCHEZ, Anabel. *Fermentación de malta empleando un sistema semicontinuo en el proceso de elaboración de cerveza*. p. 11.

2.10. Levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*)

“La levadura *Saccharomyces cerevisiae* conocido comúnmente como levadura de cerveza o vino es uno de los compuestos de microorganismos con

¹⁶ SÁNCHEZ, Anabel. *Fermentación de malta empleando un sistema semicontinuo en el proceso de elaboración de cerveza*. p. 35.

más estudio en la industria. Los constituyentes macromoleculares de las levaduras de este tipo incluyen proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, polifosfatos, lípidos y ácidos nucleicos”.¹⁷

Las *Saccharomyces cerevisiae* convierten la glucosa y fructosa por la vía de glicólisis en compuestos etanólicos y dióxido de carbono. Además, en la reacción se producen otros subproductos de trifosfato de adenosina (mejor conocidos por ATP) que influyen el crecimiento de los microorganismos.

Sin embargo, como se hace mención en las secciones anteriores, el proceso de fermentación alcohólica por estos géneros de levadura requiere la adecuación del medio para promover la formación de biomasa. La presencia de azúcares asimilables en un proceso anaeróbico en un medio con temperatura y pH adecuados conducirán a la formación de etanol.

Es necesario considerar que algunas de las enzimas involucradas son de naturaleza inducible y, por tanto, su activación necesitará de determinados requerimientos en el cultivo para alcanzar su desarrollo y llevar en plenitud su función principal.

2.11. Destilación

La destilación es la operación unitaria utilizada para la separación de mezclas en estado líquido en sus componentes líquidos mediante la diferencia de volatilidad de los compuestos. El proceso general se basa en utilizar la diferencia en los puntos de ebullición de los compuestos para su separación en condiciones controladas. La calidad del destilado depende de los fenómenos y las variables de manejo que se antepongan en el sistema.

¹⁷ WALKER, Graeme. *Yeast physiology and biotechnology*. p. 14.

2.11.1. Destilación flash o de equilibrio

Tipo de destilación en el que la operación unitaria sucede cuando un líquido saturado se mueve a un tanque de presión relativamente baja comparada con la presión de saturación. Se caracteriza por realizarse en una sola etapa, en donde la mezcla líquida se vaporiza parcialmente para luego alcanzar el equilibrio y realizar su separación posterior.

2.11.2. Destilación simple por lotes o diferencial

Suele denominarse la variante más simple de la destilación por el equipo y técnica empleada. Su uso es especialmente realizado en laboratorios para pruebas piloto o muestras pequeñas. La destilación simple se realiza calentando la mezcla líquida inicial hasta su punto de ebullición; los componentes volátiles se evaporarán y pasarán al condensador donde serán recuperados para su efectiva separación.

2.11.3. Destilación simple con arrastre de vapor

En contraste con los otros tipos de destilación, existen casos cuando la mezcla líquida de los compuestos ebulle a elevadas temperaturas por lo que su separación a presión atmosférica resulta complicada en términos económicos y prácticos. El arrastre de vapor permite que se alcance la separación a temperaturas bajas y no se afecte la integridad de los compuestos.

2.12. Cromatografía

“La cromatografía es uno de los métodos más originales de separación para la determinación y análisis de compuestos en una mezcla. El nombre cromatografía se acredita porque las primeras separaciones se realizaron con pigmentos de material vegetal, los cuales son vistos simplemente como bandas coloridas. El

proceso se basa en el principio de migración diferencial en el cual una fase en movimiento arrastra a los componentes mientras son retenidos con criterio selectivo por compuestos estacionarios en estados sólidos o líquidos".¹⁸

- Cromatografía de gases FID

Tipo de cromatografía que consiste en la retención de una fase móvil en estado gaseoso por una en estado sólido. Se denomina FID cuando se emplea un detector especial, donde el compuesto se incinera con una llama de hidrógeno-aire que proporciona iones y electrones.

El funcionamiento del equipo inicia al emplearse una diferencia de potencial al lado adyacente del quemador y un electrodo que se encuentra por encima de la llama; un amplificador dirige la corriente producida donde se caracteriza la cantidad de carbono con la cantidad de iones obtenidos en un intervalo de tiempo.

El detector FID presenta la desventaja de ser extremadamente sensible a las impurezas que puedan encontrarse tanto en la muestra como en la sección de la llama, ocasionando daños en el equipo e incertidumbres.

¹⁸ SKOOG, Douglas; WEST, Donald; HOLLER, James; CROUCH, Stanley; *Química analítica*. p. 45.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Variables

A continuación, se muestran las variables del etanol.

3.1.1. Variables dependientes

- Cantidad de azúcares reductores
- Rendimiento de etanol

3.1.2. Variables independientes

- Tipo de materia prima
- Tamaño de partícula (mm)
- Tiempo de hidrólisis alcalina (h)
- Tiempo de hidrólisis ácida (h)
- Tiempo de fermentación (h)

3.2. Delimitación del campo de estudio

- Área: bioingeniería.
- Industria: biocombustibles.
- Proceso: rendimiento porcentual de etanol obtenido a partir de la hidrólisis ácida de la cáscara de mandarina, cáscara de limón y cáscara de naranja.

3.3. Recursos humanos disponibles

Investigador: Br. Luis Haggeo Us García
Asesor: Ing. Químico César Ariel Villela Rodas

3.4. Recursos materiales disponibles

A continuación, se muestran los recursos materiales disponibles.

3.4.1. Equipo

Véase el equipo por utilizar.

3.4.1.1. Medición

- Balanza analítica
- Medidor de pH
- Cromatógrafo de gases FID
- Termómetro de alcohol
- Termómetro de digital

3.4.1.2. Auxiliar

- Molino
- Tamiz de mesh 12
- Plancha de calentamiento
- Mangueras
- Rejillas de asbesto
- Soporte universal

- Papel filtro
- Campana de extracción de gases
- Pinzas

3.4.2. Cristalería

A continuación, se muestran los instrumentos de cristalería utilizados.

3.4.2.1. Instrumentos de medición

- Balón aforado de 100 mL
- Balón aforado 250 mL
- Pipeta serológica de 10 mL
- Bureta de 50 mL

3.4.2.2. Auxiliar

- Probeta de 50 mL
- Tubos de ensayo
- Condensador de bolas
- Beaker de 100 mL
- Beaker de 250 mL
- Vidrio reloj
- Varilla de agitación
- Earlenmeyer de 100 mL
- Earlenmeyer de 250 mL
- Cabeza de destilación

3.4.3. Reactivos y materia prima

Ahora se muestran los reactivos y materia prima utilizados.

3.4.3.1. Materia prima

- Cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*)
- Cáscara de naranja (*Citrus sinensis L.*)
- Cáscara de limón (*Citrus latifolia*)
- Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)

3.4.3.2. Reactivos

- Hidróxido de sodio grado reactivo
- Ácido sulfúrico grado reactivo
- Sulfato de cobre (II) grado reactivo
- Citrato de sodio grado reactivo
- Carbonato anhídrido de sodio grado reactivo

3.5. Técnica cuantitativa o cualitativa

La investigación estará basada en las técnicas cuantitativas y cualitativas, ya que el experimento va a estar influido por variables dependientes e independientes con valores numéricos. Sin embargo, también se necesitará la técnica cualitativa utilizada entre los tratamientos para la identificación de azúcares reductores.

3.5.1. Hidrólisis alcalina

- Pulverizar y tamizar la materia prima.
- Una vez tamizado, la materia prima se macerará (maceración estática) en una solución 0,1 M de hidróxido de sodio durante 20 minutos.
- La materia vegetal es filtrada y separada del solvente.

3.5.2. Hidrólisis ácida

- A la materia prima pretratada se le realiza la lixiviación mediante maceración estática con reflujo con ácido sulfúrico al 4 % v/v como solvente en función de un periodo de 2 y 4 horas respectivamente para cada analito.
- Filtrar el jarabe glucosado obtenido.

3.5.3. Eliminación de compuestos inhibidores de la fermentación

- Al jarabe glucosado obtenido se le adicionará una solución 5M de NaOH hasta llegar a un pH mayor a 10.
- Agregar ácido sulfúrico hasta llegar a un pH entre 5 y 6.
- Dejar reposar durante 20 minutos.
- Filtrar los compuestos inhibidores de la disolución.

3.5.4. Destilación y cromatografía de gases FID

Posteriormente a la fermentación del jarabe glucosado se realizará la destilación simple de cada una de las muestras a una temperatura de 80 °C y se realizará una cromatografía de gases FID, obteniendo el porcentaje v/v de etanol.

Con los resultados obtenidos se tiene rendimiento a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{Cantidad de bioetanol}}{\text{Cantidad de biomasa de muestra}} \times 100$$

Donde la cantidad para cada sustrato de estudio fue de 100 gramos.

3.6. Recolección, ordenamiento y procesado de la información

Se utilizará el mismo tipo de ordenamiento, recolección y procesado de datos para las tres muestras de la experimentación.

Tabla IV. **Volumen de ácido y base utilizado para la eliminación de compuestos inhibidores luego de la hidrólisis ácida de 2 horas**

Sustrato	Corrida	Volumen de NaOH (mL)	Volumen de H ₂ SO ₄ (mL)
Mandarina	1	12,50	1,90
	2	14,30	1,70
	3	15,10	2,30
Naranja	1	13,10	1,60
	2	14,70	1,90
	3	12,90	1,80
Limón	1	15,20	1,90
	2	18,40	1,40
	3	14,50	1,50

Fuente: elaboración propia, con datos del Laboratorio de Fisicoquímica, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, USAC.

Tabla V. **Volumen de ácido y base utilizado para la eliminación de compuestos inhibidores luego de la hidrólisis ácida de 4 horas**

Sustrato	Corrida	Volumen de NaOH (mL)	Volumen de H ₂ SO ₄ (mL)
Mandarina	1	14,60	1,40
	2	13,50	1,30
	3	13,70	1,30
Naranja	1	16,60	1,70
	2	15,00	1,50
	3	17,10	1,90
Limón	1	17,90	2,60
	2	14,80	2,00
	3	15,50	2,60

Fuente: elaboración propia, con datos del Laboratorio de Físicoquímica, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, USAC.

Tabla VI. **pH de jarabe glucosado obtenido de la hidrólisis ácida de 2 horas**

Sustrato	Corrida	pH
Mandarina	1	5,40
	2	5,60
	3	5,10
Naranja	1	5,30
	2	5,30
	3	5,20
Limón	1	5,40
	2	5,50
	3	5,30

Fuente: elaboración propia, con datos del Laboratorio de Físicoquímica, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, USAC.

Tabla VII. **pH de jarabe glucosado obtenido en la hidrólisis ácida de 4 horas**

Sustrato	Corrida	pH
Mandarina	1	5,20
	2	5,30
	3	5,20
Naranja	1	5,30
	2	5,40
	3	5,10
Limón	1	5,50
	2	5,20
	3	5,40

Fuente: elaboración propia, con datos del Laboratorio de Físicoquímica, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, USAC.

Tabla VIII. **Prueba de Benedict en los hidrolizados de la cáscara de cada sustrato**

Sustrato	Tiempo de hidrólisis ácida (h)	Prueba de Benedict		
		Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3
Mandarina	2	Positiva	Positiva	Positiva
	4	Positiva	Positiva	Positiva
Naranja	2	Positiva	Positiva	Positiva
	4	Positiva	Positiva	Positiva
Limón	2	Positiva	Positiva	Positiva
	4	Positiva	Positiva	Positiva

Fuente: elaboración propia, con datos del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Tabla IX. **Volumen de destilado obtenido de cada sustrato**

Sustrato	Tiempo de hidrolisis ácida (h)	Corrida	Volumen (mL)
Mandarina	2	1	25,00
		2	24,00
		3	24,00
	4	1	30,00
		2	33,00
		3	29,00
Naranja	2	1	26,00
		2	25,00
		3	28,00
	4	1	31,00
		2	38,00
		3	34,00
Limón	2	1	23,00
		2	22,00
		3	22,00
	4	1	23,00
		2	23,00
		3	24,00

Fuente: elaboración propia, con datos del Laboratorio de Físicoquímica, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, USAC.

Tabla X. **Porcentaje v/v (mL etanol / mL solución) de etanol obtenido de cada sustrato mediante cromatografía de gases FID**

Sustrato	Tiempo de hidrolisis ácida (h)	Corrida	Muestra	Porcentaje (v/v)
Mandarina	2	1	M2-1	1,3180
		2	M2-2	1,6520
		3	M2-3	1,3820
	4	1	M4-1	1,3840
		2	M4-2	1,7410
		3	M4-3	1,1760
Naranja	2	1	N2-1	1,4510
		2	N2-2	1,8830

	4	3	N2-3	1,2550
		1	N4-1	1,2120
		2	N4-2	2,0170
		3	N4-3	1,5870
Limón	2	1	L2-1	0,5610
		2	L2-2	0,3620
		3	L2-3	0,3900
	4	1	L4-1	0,6490
		2	L4-2	0,8210
		3	L4-3	0,9200

Fuente: elaboración propia, con datos del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

3.7. Análisis estadístico

A continuación, se muestra el análisis estadístico.

3.7.1. Diseño experimental

El diseño experimental estará constituido por tres diferentes sustratos y se variará el tiempo de hidrólisis ácida en 2 y 4 horas, y se realizarán tres réplicas de cada muestra que constituirá la parte experimental de la investigación. Por lo tanto, se obtendrán 18 unidades experimentales.

3.7.2. Media aritmética

Donde:

\bar{x} = media

$\sum_i^N X_i$ = sumatoria de valores

N = número de datos

3.7.3. Desviación estándar

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N}} \quad [\text{Ec. 2}]$$

Donde:

σ = desviación estándar

\bar{x} = valor promedio

x_i = valor de la muestra

N = número de datos

3.7.4. Varianza

$$\sigma^2 = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N} \quad [\text{Ec. 3}]$$

Donde:

σ^2 = varianza

\bar{x} = valor promedio

x_i = valor de la muestra

N = número de datos

3.7.5. Número de repeticiones recomendadas

El número de repeticiones para un experimento, con un nivel de confianza del 95 % $Z_{\alpha/2} = 1,96$ y asumiendo que los datos de comportan en forma normal se determina de la siguiente manera:

$$n = \left(\frac{Z_{\alpha/2} * \sigma}{\varepsilon} \right)^2 \quad [\text{Ec. 4}]$$

n = número de repeticiones recomendadas

E= error máximo admisible

σ = desviación estándar

3.7.6. Análisis de varianza

La prueba de hipótesis se realizará por medio del análisis de varianza a partir de la diferencia entre medias. Se asume que las varianzas son iguales de las k poblaciones. Se utiliza la tabla de ANOVA.

Tabla XI. Prueba ANOVA

Fuentes	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F prueba	F crítica
Tratamientos	SST	k-1	MST	MST/MSE	$F(\alpha, k-1, n-1)$
Error	SSE	n-k	MSE		
Total	SStotal	n-1			

Fuente: WALPOE, Ronald. Probabilidad y estadística para ingenieros.

La comprobación de la hipótesis nula y alternativa se realizará utilizando el análisis de varianza de un factor por medio de Microsoft Excel, utilizando una significancia del 5 %.

3.7.7. Prueba de Tukey

El método de Tukey se utiliza en ANOVA para crear intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de los factores mientras controla la tasa de error por familia en un nivel especificado.

Este método tiene como objetivo encontrar el o los mejores tratamientos del experimento, cosa que no se puede determinar simplemente por el análisis de varianza ya que este solo pone a prueba las hipótesis nulas y alternativas.

$$(\bar{y}_1 - \bar{y}_2) - q_{(t, v_c, \alpha/2)} \sqrt{Ms_c \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)} \leq \bar{\mu}_1 - \bar{\mu}_2 \leq (\bar{y}_1 - \bar{y}_2) + q_{(a, v_c, \alpha/2)} \sqrt{Ms_c \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)} = 1 - \alpha \quad [\text{Ec. 5}]$$

Donde:

q = amplitud total estudentizada. Valor tabulado en función de:

α = nivel de significancia

t = número de tratamientos

v_c = grados de libertad del error experimental

Ms_c = cuadrado medio del error experimental

N = número de réplicas de las medias de los tratamientos a ser comparadas

Si la diferencia entre dos promedios es mayor que el comparador, se concluye que los dos promedios no son iguales, caso contrario se concluye que sí son iguales.

3.8. Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información

A continuación, se presentan cálculos a partir de la información del laboratorio, tales como: cantidad de masa y volumen en etanol presente y el rendimiento porcentual de etanol obtenido de cada sustrato.

Tabla XII. **Análisis del porcentaje v/v (mL etanol / mL solución) de etanol obtenido de la cáscara de cada sustrato mediante cromatografía de gases FID**

Sustrato	Tiempo de hidrólisis ácida (h)	Porcentaje v/v				
		C1	C2	C3	\bar{x}	σ
Mandarina	2	1,3180	1,6520	1,3820	1,4570	0,1773
	4	1,3840	1,7410	1,1760	1,4337	0,2858
Naranja	2	1,4510	1,8830	1,2550	1,5297	0,3213
	4	1,2120	2,0170	1,5870	1,6053	0,4028
Limón	2	0,5610	0,3620	0,3900	0,4377	0,1077
	4	0,6490	0,8210	0,9200	0,7967	0,1371

Fuente: elaboración propia, con datos del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Tabla XIII. **Análisis del rendimiento porcentual de etanol obtenido de la cáscara de cada sustrato**

Sustrato	Tiempo de hidrólisis ácida (h)	Rendimiento (%)				
		C1	C2	C3	\bar{x}	σ
Mandarina	2	0,2600	0,3128	0,2617	0,2782	0,0300
	4	0,3276	0,4533	0,2691	0,3500	0,0941
Naranja	2	0,2977	0,3714	0,2773	0,3154	0,0495
	4	0,2964	0,6047	0,4257	0,4423	0,1248
Limón	2	0,1018	0,0628	0,0677	0,0774	0,0212
	4	0,1178	0,1490	0,1742	0,1470	0,0283

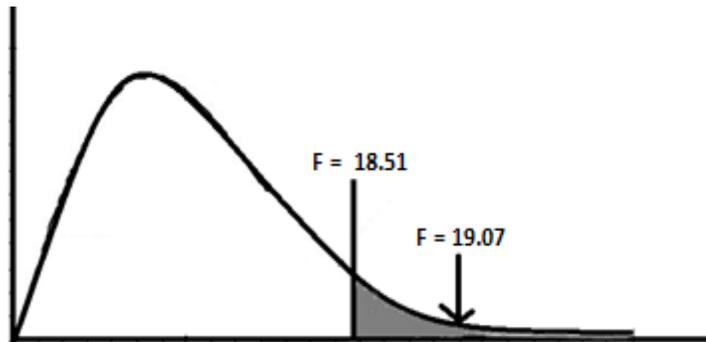
Fuente: Datos experimentales, Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Tabla XIV. **Anova del rendimiento porcentual de etanol obtenido de la cáscara de mandarina**

Fuentes	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Tratamientos	0,0055	1	0,0055	19,0677	18,5128
Error	0,0006	2	0,0003		
Total	0,0060	3			

Fuente: elaboración propia.

Figura 9. **Distribución de Fisher del rendimiento porcentual de etanol obtenido de la cáscara de mandarina**



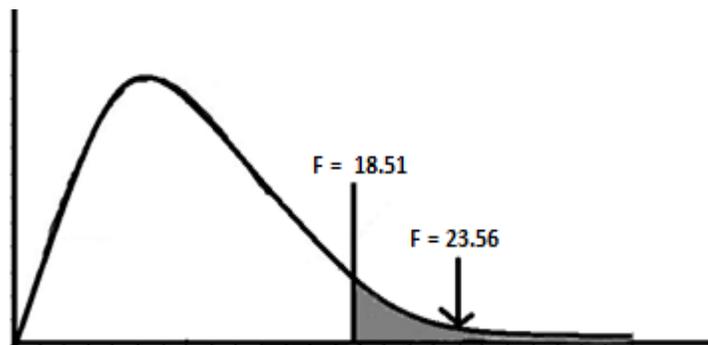
Fuente: elaboración propia.

Tabla XV. **Anova del rendimiento porcentual de etanol obtenido de la cáscara de naranja**

Fuentes	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Tratamientos	0,0364	1	0,0364	23,5628	18,5128
Error	0,0031	2	0,0015		
Total	0,0395	3			

Fuente: elaboración propia.

Figura 10. **Distribución de Fisher del rendimiento porcentual de etanol obtenido de la cáscara de naranja**



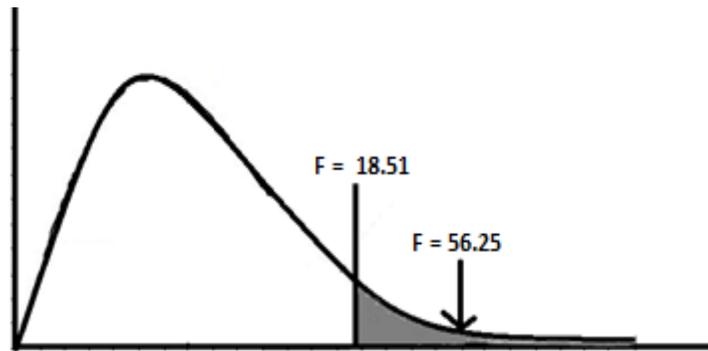
Fuente: elaboración propia.

Tabla XVI. **Anova del rendimiento porcentual de etanol obtenido de la cáscara de limón**

Fuentes	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Tratamientos	0,0093	1	0,0093	56,2521	18,5128
Error	0,0003	2	0,0002		
Total	0,0096	3			

Fuente: elaboración propia.

Figura 11. **Distribución de Fisher del rendimiento porcentual de etanol obtenido de la cáscara de limón**



Fuente: elaboración propia.

Para realizar el análisis de varianza (ANOVA) se siguió una distribución de Fisher con un nivel de confianza del 95 %, para evaluar la aceptabilidad o rechazo de cada una de las hipótesis estadísticas planteadas se tomó en cuenta el siguiente criterio: si la F es mayor a la F crítica se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, si la F es menor que la F crítica se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alternativa.

Lo cual se demuestra en las figuras de régimen crítico del análisis, donde se acepta la hipótesis nula cuando está en el rango de aceptabilidad, y se acepta la hipótesis alternativa cuando esta entra en el rango sombreado de gris.

Tabla XVII. **Resumen de resultados de análisis ANOVA**

Análisis	F	F critico	Cumplimiento de hipótesis	
			Nula	Alternativa
El rendimiento porcentual de etanol obtenido en la cáscara de mandarina en función del tiempo de hidrólisis ácida.	19,0677	18,5128		X
El rendimiento porcentual de etanol obtenido en la cáscara de naranja en función del tiempo de hidrólisis ácida.	23,5629	18,5128		X
El rendimiento porcentual de etanol obtenido en la cáscara de limón en función del tiempo de hidrólisis ácida.	56,2521	18,5128		X

Fuente: elaboración propia.

3.8.1. **Número de repeticiones recomendadas**

El número de repeticiones para un experimento, con un nivel de confianza del 95 % $Z_{\alpha/2} = 1,96$ y asumiendo que los datos de comportan en forma normal se determina de la siguiente manera:

$$n = \left(\frac{Z_{\alpha/2} * \sigma}{\varepsilon} \right)^2$$

Ejemplo: determine el número de repeticiones que se debe de medir la concentración de etanol en la cáscara de mandarina en un tiempo de hidrólisis ácida de 2 horas si se tiene una desviación estándar de 0,1773, una media de $\bar{x} = 1,4507$ y la medición de la primera replica es de 1,3180 (Datos obtenidos de la tabla No. XII).

$$n = \left(\frac{1,96 * 0,1773}{1,4507 - 1,3180} \right)^2 = 5,85 = 6 \text{ repeticiones o réplicas}$$

3.8.2. Programas por utilizar para el análisis de datos

A continuación, se muestran los programas por utilizar para el análisis de datos.

3.8.2.1. Microsoft Word 2016

Se utilizará este programa para editar y presentar el informe con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación.

3.8.2.2. Microsoft Excel 2016

Se utilizará como una hoja electrónica que permitirá automatizar diversas operaciones matemáticas y parámetros estadísticos como media aritmética, desviación estándar y los análisis de varianza correspondientes para la evaluación de las hipótesis de este trabajo de investigación.

4. RESULTADOS

4.1. Identificación de azúcares reductores

A continuación, se muestra en la tabla XVIII, la prueba de Benedict en los hidrolizados de la cáscara de cada sustrato.

Tabla XVIII. **Prueba de Benedict en los hidrolizados de la cáscara de cada sustrato**

Sustrato	Tiempo de hidrólisis ácida (h)	Prueba de Benedict
Mandarina	2	Positiva
	4	Positiva
Naranja	2	Positiva
	4	Positiva
Limón	2	Positiva
	4	Positiva

Fuente: elaboración propia, con datos del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

4.2. Concentración de etanol en cada sustrato

A continuación, se muestra en la tabla XIX, la concentración de etanol obtenido de la cáscara de cada sustrato mediante cromatografía de gases FID.

Tabla XIX. **Concentración de etanol obtenido de la cáscara de cada sustrato mediante cromatografía de gases FID**

Sustrato	Tiempo de hidrólisis ácida (h)	Porcentaje v/v (mL etanol / mL solución)	σ
Mandarina	2	1,4507	0,1773
	4	1,4337	0,2858
Naranja	2	1,5297	0,3213
	4	1,6053	0,4028
Limón	2	0,4377	0,1077
	4	0,7967	0,1371

Fuente: elaboración propia, con datos del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

4.3. Rendimiento de etanol obtenido en cada sustrato

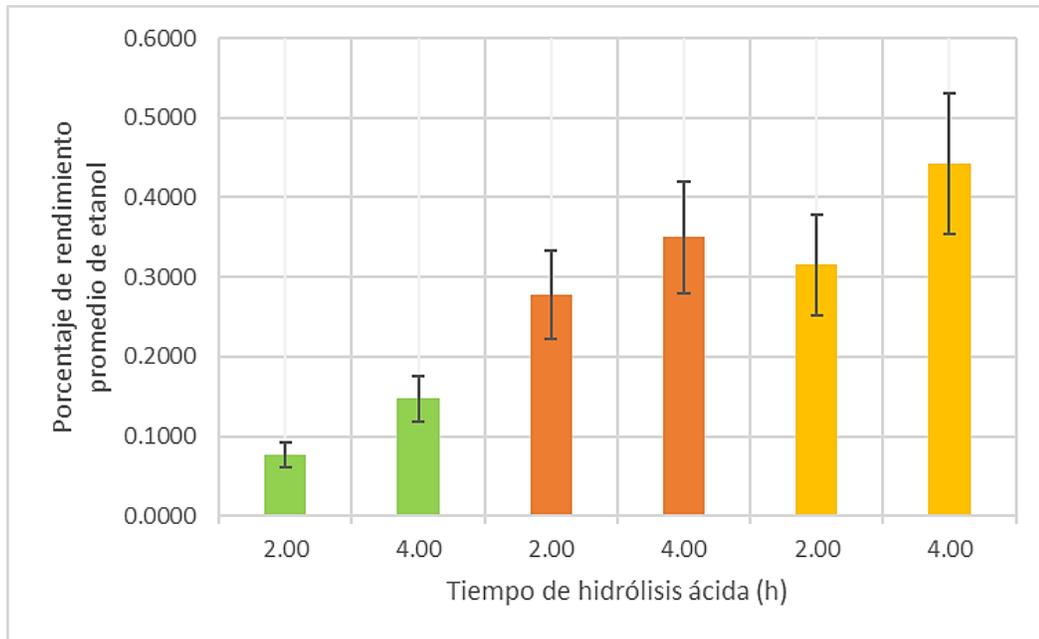
Ahora, véase el rendimiento de etanol.

Tabla XX. **Porcentaje de rendimiento etanol obtenido en cada sustrato en función del tiempo de hidrólisis ácida**

Sustrato	Tiempo de hidrólisis ácida (h)	Porcentaje de rendimiento de etanol	σ
Mandarina	2	0,2782	0,0301
	4	0,3501	0,0941
Naranja	2	0,3154	0,0495
	4	0,4423	0,1248
Limón	2	0,0774	0,0212
	4	0,1470	0,0283

Fuente: elaboración propia, con datos del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Figura 12. **Porcentaje de rendimiento promedio de etanol obtenido en cada sustrato en función del tiempo de hidrólisis ácida**



Continuación figura 12.

Color	Descripción	Variable	Variable	Incerteza máxima	
		Dep.	Indep.	Variable Dep.	Variable Indep.
	Limón	%R	t	0,03	0,001
	Mandarina	%R	t	0,09	0,001
	Naranja	%R	t	0,12	0,001

Fuente: elaboración propia.

4.4. Diferencia significativa del rendimiento de etanol obtenido de cada sustrato

A continuación, se muestra la diferencia significativa del rendimiento de etanol obtenido de cada sustrato.

Tabla XXI. **Resultados de análisis ANOVA del porcentaje de rendimiento etanol obtenido en cada sustrato en función del tiempo de hidrólisis ácida**

Sustrato	F	Probabilidad	F crítico	Cumplimiento de hipótesis	
				Nula	Alternativa
Mandarina	19,0677	0,1997	18,5128		X
Naranja	23,5629	0,0520	18,5128		X
Limón	56,2521	0,0173	18,5128		X

Fuente: elaboración propia.

5. INTERPRETACION DE RESULTADOS

El objetivo principal de la presente investigación fue evaluar el rendimiento de etanol obtenido a partir de la hidrólisis ácida de la cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*), cáscara de naranja (*Citrus sinensis L.*) y cáscara de limón (*Citrus latifolia*) mediante fermentación alcohólica con *Saccharomyces cerevisiae* a nivel laboratorio.

Partiendo de la consideración de que este tipo de materia prima, en su mayoría, es encontrada sin un propósito de reutilización, aprovechamiento o aplicación en algún proceso como fuente de insumos, y que generalmente son descartadas como desechos o residuos agroindustriales.

Con base a la información recopilada de la caracterización y composición de las cáscaras de estos tres diferentes frutos cítricos, se seleccionaron procedimientos, métodos y condiciones adecuadas para la obtención de bioetanol juntamente con la opción del aprovechamiento de este tipo de material vegetal.

5.1. Identificación de azúcares reductores

En la tabla XVIII, se muestran los resultados obtenidos de la prueba de Benedict para la identificación de azúcares reductores en los hidrolizados ácidos de cada sustrato. El análisis cualitativo se realizó en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

La selección del ensayo de Benedict para la identificación de azúcares reductores en el estudio se realizó en base a su funcionalidad y simpleza. Siendo este, en compañía con el ensayo de Fehling, los métodos cualitativos visuales óptimos, en cuanto a recursos, para el reconocimiento de tales compuestos.

El método utilizado para la identificación se basa en reacciones de óxido reducción en donde el hidrolizado se torna a un color azul por la adición del ion Cu^{2+} , en un medio alcalino, el cual se puede reducir por efecto del grupo aldehído de los azúcares reductores a su forma Cu^+ . Este ion, presenta la ventaja de observarse como un precipitado de color rojo-anaranjado respectivo al óxido cuproso.

En cada una de las muestras de hidrolizado, desde un tiempo de hidrólisis ácida de 2 a 4 horas, sometida a la prueba de Benedict se pudo observar la formación de un precipitado rojizo-anaranjado con lo cual se pudo comprobar la presencia de azúcares reductores y, por ende, aseverar que la reacción de identificación fue positiva en cada una de las muestras de cada especie. Un comportamiento esperado según la información recopilada de la composición y caracterización de las cáscaras de estos frutos cítricos.¹⁹

Asimismo, es preciso observar en el informe de resultados de la prueba de Benedict proporcionado por LIPRONAT adjuntado en la sección de Anexos, que para cada sustrato varía la cantidad de precipitado formado, indicando la variación de azúcares reductores extraídos en cada muestra dada su dependencia en la reacción.

¹⁹ MARÍN, Francisco; SOLER, Cristina; BENAVENTE-GARCÍA, Obdulio; CASTILLO, Julian, PÉREZ-ÁLVAREZ, José. *Byproducts from different citrus processes as a source of customized functional fibres*. p. 50.

Los resultados positivos en la prueba de identificación de azúcares reductores enmarcan la adecuada presencia de estos compuestos en la cáscara de cada uno de los tres diferentes frutos cítricos seleccionados para su posterior fermentación y la efectividad del método de extracción y el solvente utilizado; además de las condiciones y parámetros de estudio previamente establecidas.

En base a los resultados obtenidos en esta fase de la investigación, se procedió a la siguiente etapa del experimento, fermentando con *Saccharomyces cerevisiae* los jarabes glucosados de cada sustrato y así obtener una solución etanólica. Posteriormente se realizó la separación de etanol del fermento mediante destilación simple.

5.2. Concentración de etanol

Para la cuantificación de etanol en los destilados de cada sustrato se utilizó la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización de llama FID, realizado en el Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada de la Universidad del Valle de Guatemala.

Los resultados obtenidos del equipo se pueden observar en las figuras adjuntas en la sección de Anexos, desde las curvas de calibración de etanol e isopropanol (empleado como estándar interno) hasta la cromatografía individual de cada muestra.

En la tabla XIX, se muestran los resultados tabulados de la concentración de etanol promedio obtenidos de la cáscara de cada sustrato en función del tiempo de hidrólisis ácida, en el cual se puede observar que la cáscara de naranja presenta una mayor concentración de etanol en porcentaje v/v (mL de etanol / mL de solución) con un valor de $1,6053 \pm 0,4028$ %, seguido de la cáscara de

mandarina con un valor de $1,4507 \pm 0,1773$ % y la cáscara de limón con $0,7967 \pm 0,1371$ %.

Sin embargo, cabe resaltar que la concentración obtenida en porcentaje v/v se encuentra en función del volumen de destilado obtenido mediante destilación simple y que en cada una de las muestras dichos valores difieren. No obstante, en las tablas XXII y XXIII se especifican la cantidad en volumen y masa de etanol obtenido en cada destilado, apoyando los argumentos establecidos en base a la información de la tabla XIX.

Considerando lo estipulado anteriormente, se puede observar que en cada sustrato predispuesto a un tiempo de extracción o de hidrólisis ácida de 4 horas la concentración de etanol es mayor respecto de la concentración obtenida a un tiempo de hidrólisis ácida de 2 horas.

Dicho comportamiento presenta la tendencia esperada según la cinética de la hidrólisis ácida para la obtención de azúcares reductores, en el cual al someter a materiales lignocelulósicos a un mayor tiempo de hidrólisis ácida se favorece la obtención de azúcares reductores de los sustratos.²⁰

Asimismo, la extracción de azúcares reductores también se ve afectado por la concentración del solvente, debido a que la exposición por largos intervalos de tiempo de ácido sulfúrico a concentraciones elevadas degrada las moléculas de azúcares reductores. Por lo cual, en la presente investigación se utilizó una concentración al 4 % del solvente (ácido sulfúrico) para descartar tal efecto en los tiempos de hidrólisis ácida establecidos y, a su vez, en los resultados.

²⁰ DOMÍNGUEZ, María; CASTILLO, Alberto. *Estudio de la cinética de la hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar sin pretratamiento para la obtención de azúcares reductores*. p. 157.

Mediante la concentración de etanol obtenida en cada muestra, se procedió a la siguiente etapa de cálculo, determinando la cantidad de masa de etanol proveniente del destilado de cada sustrato y simultáneamente el rendimiento porcentual de etanol presente en cada una de ellas, a partir de una base de trabajo de 100 gramos por iteración.

5.3. Rendimiento de etanol

En la tabla XX se muestran los resultados del rendimiento de etanol de cada especie obtenidos al realizar la variación del tiempo de hidrólisis ácida en un rango de 2 y 4 horas, en el cual se puede observar, semejante a la concentración de etanol obtenido en cada sustrato, que:

- La cáscara naranja (*Citrus sinensis L.*) presenta un rendimiento de etanol mayor con un valor de $0,4423 \pm 0,1248$ %, seguido de la cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*), con $0,3501 \pm 0,0941$ % y la cáscara de limón (*Citrus latifolia*) con $0,1470 \pm 0,028$ %.
- El rendimiento de etanol de cada especie predispuesto a un tiempo de hidrólisis ácida de 4 horas es mayor respecto de los rendimientos obtenidos en un tiempo de hidrólisis ácida de 2 horas.

Ambas tendencias y comportamientos pueden observarse de mejor forma en la figura 12, donde los datos promedios de cada especie se encuentran representados mediante un gráfico de barras juntamente con las incertezas de cada variable.

Los resultados obtenidos reflejan la efectividad en la transformación de materia vegetal en bioetanol luego de completar cada fase experimental

delimitado en el estudio. Sin embargo, tales rendimientos obtenidos se encuentran por debajo de los rendimientos alcohólicos en cuanto a la especie de naranja (*Citrus sinensis* L.) y diferente a las especies de mandarina y limón debido al uso de otros géneros de estos tipos de familias.²¹

Pese a los resultados obtenidos, se encuentra adecuada la comparación del rendimiento de etanol obtenido con otros tipos de fuente vegetal o materiales lignocelulósicos en otras investigaciones de este tipo, debido a la identificación de variables de trabajo que puedan mejorar los rendimientos encontrados.

Así pues, los rendimientos de etanol obtenidos en la investigación se encuentran condicionados y afectados por las condiciones, métodos y parámetros de trabajo seleccionados anteriormente mencionados. Además de estar atribuidos a los pretratamientos empleados en la materia vegetal, siendo posible incluir otros tipos de pretratamientos fisicoquímicos y/o biológicos para mejorar la disposición de azúcares reductores.

Otro de los factores que representa una incidencia en los resultados obtenidos del rendimiento de etanol en el estudio es el tamaño o la escala en la cual fue realizado. Permitiendo evaluar su posible incremento y optimización en procesos de escala industrial.²²

Si bien, es necesario incluir aspectos relacionados al seguimiento, verificación de procesos y factibilidad económica para llevar a cabo estos

²¹ TEJEDA, Lesly. *Evaluación del potencial de las cáscaras de frutas en la obtención de bioetanol*. p. 30.

²² SÁNCHEZ, Anabel. *Fermentación de malta empleando un sistema semicontinuo en el proceso de elaboración de cerveza*. p. 35.

estudios a una escala mayor, el beneficio puede demostrarse en la mejora del uso de recursos paralelamente al alcance de la sostenibilidad socioambiental.

Adicionalmente, es importante mencionar que el rendimiento de etanol obtenido en cada especie se ve afectado significativamente dependiendo de la procedencia (o región demográfica) de cada uno de los frutos cítricos analizados. Conjuntamente se atribuye también a la época de colecta y métodos de almacenaje.

5.4. Diferencia significativa del rendimiento de etanol

Se determinó si el rendimiento de etanol en cada sustrato era dependiente o independiente a los tiempos de hidrólisis ácida de trabajo establecidos, es decir, si la variable respuesta presenta un efecto significativo ante tal variable de control. Caso en el cual, únicamente puede determinarse mediante herramientas estadísticas aplicado al conjunto de datos calculados y obtenidos en cada sustrato.

Por ello, se realizó un análisis de varianza (denominado como ANOVA) para determinar si los rendimientos porcentuales de etanol encontrados para cada especie correspondían con esta dependencia o no, mediante la prueba de distribución de Fischer, basada en el empleo de estimaciones poblacionales y grados de libertad de la agrupación de datos.

En la tabla XXI puede observarse la prueba de Fischer que confirma que los rendimientos de etanol para cada especie son significativamente diferentes entre sí, concluyendo que poseen una dependencia con el tiempo de hidrólisis ácida de trabajo, y, por ende, afirmar el cumplimiento de las hipótesis alternativas descritas en la sección de hipótesis.

Esto se puede asimilar al observar que el valor F para la cáscara mandarina (*Citrus reticulata*), naranja (*Citrus sinensis L.*) y limón (*Citrus latifolia*) con un valor de 19,07, 23,56 y 56,25 respectivamente para cada especie es mayor al F crítico del estudio para un nivel de significancia establecido del 5 %.

Asimismo, existe una probabilidad del 0,19, 0,05 y 0,02 % respectivo de cada especie de que esta aseveración sea incorrecta para la dependencia entre tales variables. Las probabilidades encontradas en cada una de las especies no se deben a la dispersión y variabilidad existente entre el conjunto de valores de rendimiento de etanol obtenidos en función del tiempo de extracción o de hidrólisis ácida.

En contraste, es recomendable el aumento en el número de tratamientos y en el número de repeticiones en cada especie analizada para enriquecer el estudio respecto de ponderaciones e interpretaciones estadísticas, permitiendo así realizar otros análisis descriptivos como la prueba de Tukey, la cual considera las diferencias entre medias de los tratamientos en una misma experiencia, con la exigencia de que el número de repeticiones en cada tratamiento sea constante.

Proporcionando, además, mejor descripción a nivel general de los resultados del rendimiento de etanol obtenidos en compañía con la determinación y evaluación de la eficacia del proceso experimental en cada una de las repeticiones designadas para cada especie.

CONCLUSIONES

1. Los hidrolizados de cada especie dieron positivo para azúcares reductores por medio del ensayo de Benedict.
2. La concentración de etanol obtenida en el destilado de la cáscara de mandarina (*citrus reticulata*) por medio de cromatografía de gases FID para un tiempo de hidrólisis ácida de 2 horas fue de $1,4507 \pm 0,1773$ % v/v, y para un tiempo de 4 horas $1,4337 \pm 0,2858$ % v/v.
3. La concentración de etanol obtenida en el destilado de la cáscara de naranja (*citrus sinensis L.*) por medio de cromatografía de gases FID para un tiempo de hidrólisis ácida de 2 horas fue de $1,5297 \pm 0,3213$ % v/v, y para un tiempo de 4 horas $1,6053 \pm 0,4028$ % v/v.
4. La concentración de etanol obtenida en el destilado de la cáscara de limón (*citrus latifolia*) por medio de cromatografía de gases FID para un tiempo de hidrólisis ácida de 2 horas fue de $0,4377 \pm 0,1077$ % v/v, y para un tiempo de 4 horas $0,7967 \pm 0,1371$ % v/v.
5. El rendimiento porcentual de etanol obtenido en la cáscara de mandarina (*citrus reticulata*), con un tiempo de hidrólisis ácida de 2 y 4 horas fue de $0,2782 \pm 0,0301$ % y $0,3501 \pm 0,0941$ %, respectivamente.
6. El rendimiento porcentual de etanol obtenido en la cáscara de naranja (*citrus sinensis L.*), con un tiempo de hidrólisis ácida de 2 y 4 horas fue de $0,3154 \pm 0,0495$ % y $0,4423 \pm 0,1248$ %, respectivamente.

7. El rendimiento porcentual de etanol obtenido en la cáscara de limón (*Citrus latifolia*), con un tiempo de hidrólisis ácida de 2 y 4 horas fue de $0,0774 \pm 0,0212 \%$ y $0,1470 \pm 0,0283 \%$, respectivamente.
8. Existe diferencia significativa en el rendimiento de etanol en cada sustrato al variar el tiempo de hidrólisis ácida.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar el rendimiento de etanol con materia prima proveniente de otra región y recolectada en otra estación o época del año.
2. Emplear otros pretratamientos a la materia prima para facilitar la obtención de azúcares reductores.
3. Efectuar la extracción de azúcares reductores en la cáscara de cada especie con otros métodos de lixiviación y solventes para evaluar el rendimiento extractivo.
4. Cuantificar los azúcares reductores obtenidos de los jarabes glucosados.
5. Evaluar el tiempo de fermentación de los jarabes glucosados obtenidos de la cáscara de cada especie como factor de estudio para determinar si existe variación en el rendimiento de etanol.
6. Realizar el estudio a escala planta piloto para evaluar la diferencia significativa de etanol obtenido respecto de la escala laboratorio.
7. Evaluar la factibilidad del estudio aplicado a sustratos provenientes o descartados como desechos y residuos.

BIBLIOGRAFÍA

1. ACOSTA ROMERO, Carolina. *Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia, 2012. 144 p.
2. ALARCÓN ELIAS, Aurea Victoria. *Producción de bioetanol con Zymomonas móviles*. México: Instituto Politécnico Nacional, 2010. 289 p.
3. ALBÁN, Diego; FREIRE, David. *Obtención de bioetanol a partir de residuos de naranja (Citrus sinensis) provenientes del proceso Agroindustrial en la Provincia de Bolívar*. Bolivia: El Prado, 2009. 80 p.
4. ALVIRA, Petal; TOMÁS-PEJÓ, Elia; BALLESTEROS, Mercedes; NEGRO, María José. *Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review*. Estados Unidos: Bioresource Technology, 2000. 139 p.
5. ANGULO, Alexandra Elizabeth. *Efectividad de microorganismos nativos en relación con Aspergillus niger, Clostridium thermocellum ATCC 27405 y Zymomonas Mobilis para la producción de bioetanol a partir de residuos de sandía Citrullus lanatus a escala piloto*. Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército, 2010. 63 p.

6. BALAT, Mustafa. *Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review*. Estados Unidos: *Energy Conversion and Management* 52, 2011. 875 p.
7. BACCOU, J. C.; L. F. *Spectrophotometric Method for the determination of Total Steroidal Sapogenin*. Estados Unidos: *Analyst*, 1997. 465 p.
8. BECKLEY, Victor. *Enzymes and Bacteria in Coffee Fermentation*. Kenia: Departamento de Agricultura, 1930. 230 p.
9. BOYER, Roger. *Conceptos de bioquímica*. Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc., 2002. 203 p.
10. CHOussy, Francisco. *Technical Studies on the Fermentation of Coffee*. Cuba: Agrotecnia, 1948. 120 p.
11. FRITZ, Ariel. *Processing of Coffee without Fermentation*. Guatemala: Revista Agrícola, 1933. 213 p.
12. FUKUNAGA, Edward. *A New Mechanical Coffee Demucilaging Machine*. Hawaii: Estación de Agricultura para Experimentación de Hawaii, 1957. 105 p.
13. MORALES GÓMEZ, Karen Roxana. *Reformulación de shampoo mediante la adición de agentes espesantes, manteniendo su funcionalidad y reducción de recursos*. Trabajo de graduación de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2014.

14. PEDERSON, Carl; BREED, Roy. *Coffee Fermentation*. Estados Unidos: Food Research, 1946. 302 p.
15. SIVETZ, Marcus; FOOTE, Elmer. *Coffee Processing Technology*. Estados Unidos: The Avi Publishing Company, Inc., 1963. 320 p.
16. STERN, Jarek. *Methods of Fermenting Coffee*. México: Revista Sociedad Mexicana Histórica, 1948. 50 p.
17. SUMMER, Jolinne; MYRBACK, Kendall. *The Enzymes*. Estados Unidos: Academic Press, 1951. 230 p.
18. SUMMER, Jolinne; SOMERS, Gary. *Chemistry and Methods of Enzymes*. Estados Unidos: Academic Press, 1947. 129 p.
19. TEJEDA, Lesly. *Evaluación del potencial de las cáscaras de frutas en la obtención de bioetanol*. Colombia: Universidad de Antioquia, 2014. 392 p.
20. WALKER, Gary. *Yeast physiology and biotechnology*. Estados Unidos: John Wiley and Sons Chidester, 1998. 300 p.

APÉNDICES

Apéndice 1. Datos intermedios para la determinación del rendimiento porcentual de etanol en cada especie

Se determinó el volumen de etanol en cada sustrato mediante el volumen de destilado de cada muestra y su respectiva cromatografía de gases FID. Las cuales fueron realizadas en el Laboratorio de Instrumentación de Química Avanzada de la Universidad del Valle de Guatemala, y se encuentran adjuntas en la sección de anexos:

Análisis del volumen de etanol obtenido de la cáscara de cada sustrato

Sustrato	Tiempo de hidrólisis ácida (h)	Volumen (mL)				
		C1	C2	C3	\bar{x}	σ
Mandarina	2	0,3295	0,3965	0,3317	0,3526	0,0381
	4	0,4152	0,5745	0,3410	0,4436	0,1193
Naranja	2	0,3773	0,4708	0,3514	0,3998	0,0628
	4	0,3757	0,7665	0,5396	0,5606	0,1962
Limón	2	0,1290	0,0796	0,0858	0,0982	0,0269
	4	0,1493	0,1888	0,2208	0,1863	0,0358

Obteniendo a partir de estos, la cantidad de etanol en gramos para su utilización en el cálculo de rendimiento descrito en la sección de diseño metodológico.

Continuación del apéndice 1.

Análisis de la masa de etanol obtenido de la cáscara de cada sustrato

Sustrato	Tiempo de hidrólisis ácida (h)	Masa (g)				
		C1	C2	C3	\bar{x}	σ
Mandarina	2	0,2600	0,3128	0,2617	0,2782	0,0300
	4	0,3276	0,4533	0,2691	0,3500	0,0941
Naranja	2	0,2977	0,3714	0,2773	0,3154	0,0495
	4	0,2964	0,6047	0,4257	0,4423	0,1248
Limón	2	0,1018	0,0628	0,0677	0,0774	0,0212
	4	0,1178	0,1490	0,1742	0,1470	0,0283

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 2. Fotografías del desarrollo del trabajo

Figura A. **Pretratamiento físico, disminución del tamaño de partícula para la cáscara de naranja, mandarina y limón**



Continuación el apéndice 2.



Figura B. **Pretratamiento químico, hidrólisis alcalina para la cáscara de cada sustrato**



Figura C. **Hidrólisis ácida de la cáscara de cada sustrato**



Continuación el apéndice 2.



Figura D. **Eliminación de compuestos inhibidores de la fermentación para la cáscara de cada sustrato**



Continuación del apéndice 2.

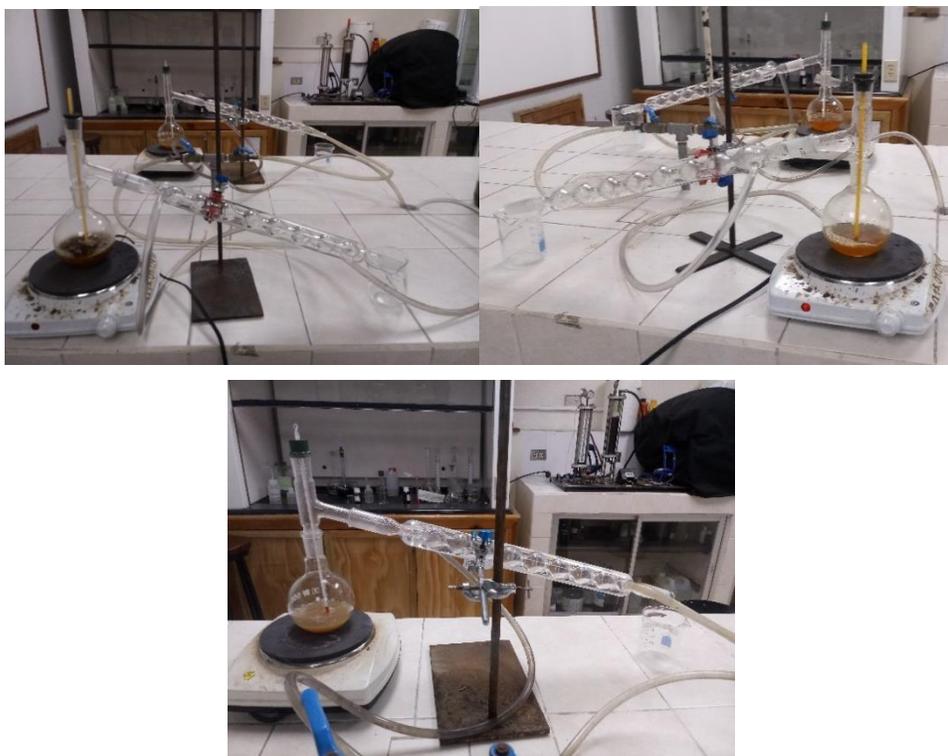


Figura E. Fermentación para la cáscara de cada sustrato



Continuación del apéndice 2.

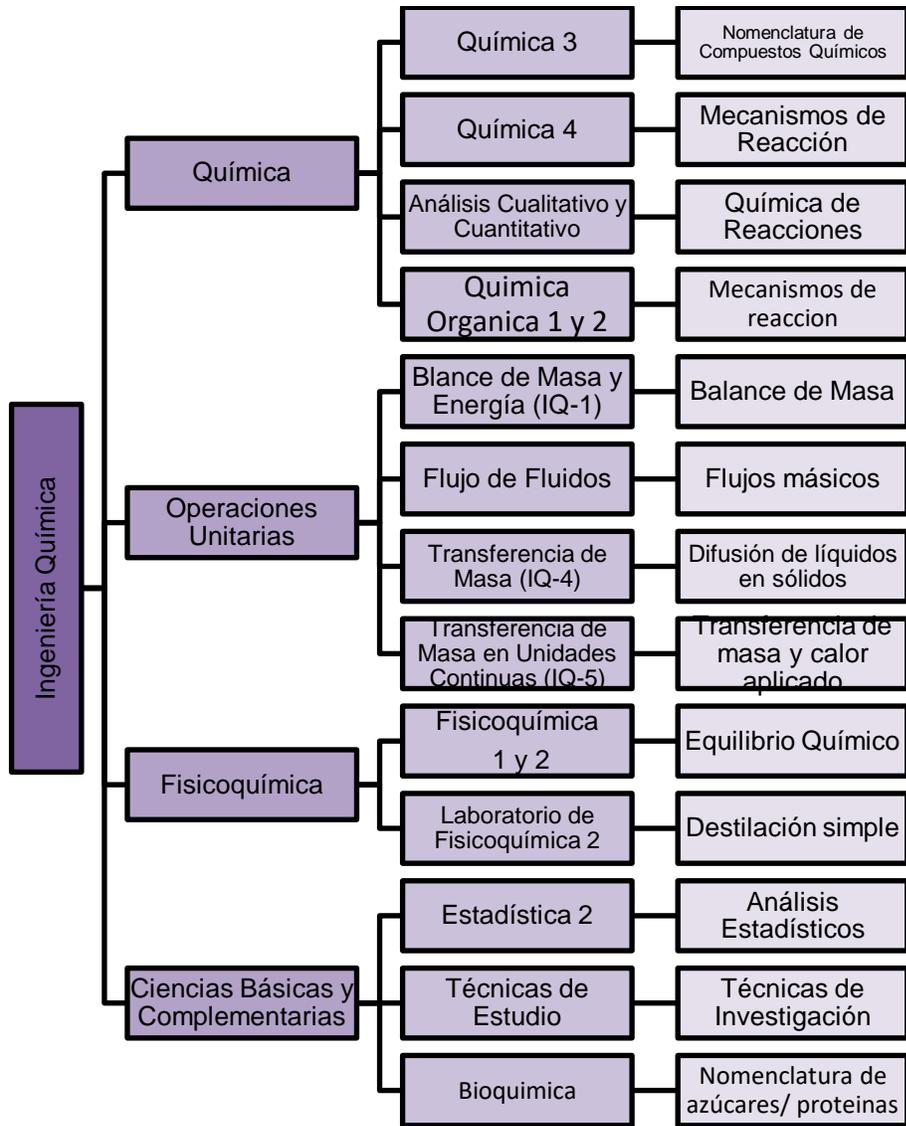
Figura F. **Destilación para la cáscara de cada sustrato**



Fuente: elaboración propia.

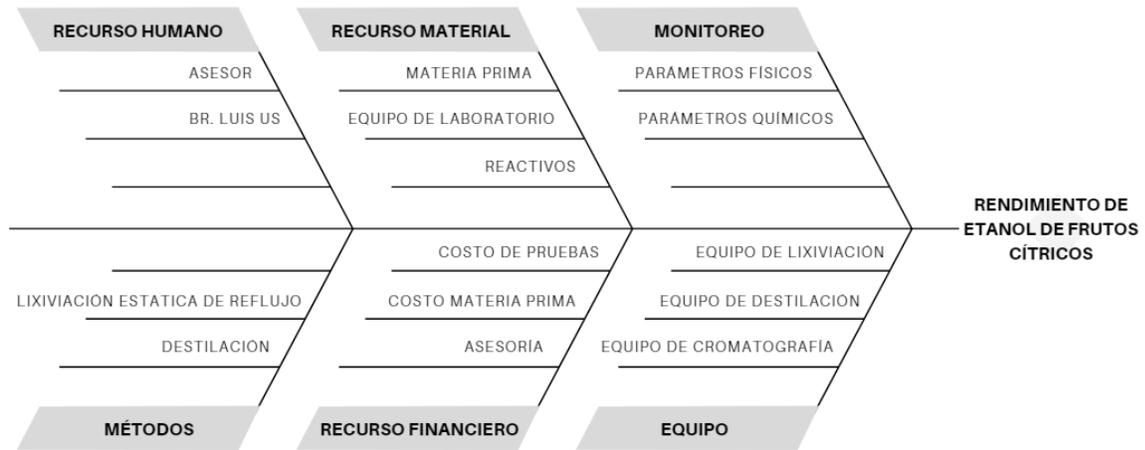
Apéndice 3. **Tabla de requisitos académicos**

Figura G. **Requisitos académicos**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 4. Diagrama de Ishikawa



Fuente: elaboración propia.

ANEXOS

Anexo 1. Curvas de calibración de etanol e isopropanol del cromatógrafo de gases FID

```

=====
                        Calibration Table
=====

Curva de calibracion Etanol

Calib. Data Modified   :      8/8/2019 10:35:12 AM

Calculate              :      Internal Standard
Based on               :      Peak Area

Rel. Reference Window :      5.000 %
Abs. Reference Window :      0.000 min
Rel. Non-ref. Window  :      5.000 %
Abs. Non-ref. Window  :      0.000 min
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Uncalibrated Peaks    :      not reported
Partial Calibration   :      Yes, identified peaks are recalibrated
Correct All Ret. Times:      No, only for identified peaks

Curve Type            :      Linear
Origin                :      Forced
Weight                :      Equal

Recalibration Settings:
Average Response      :      Average all calibrations
Average Retention Time:      Floating Average New 75%

Calibration Report Options :
  Printout of recalibrations within a sequence:
    Calibration Table after Recalibration
    Normal Report after Recalibration
  If the sequence is done with bracketing:
    Results of first cycle (ending previous bracket)

Default Sample ISTD Information (if not set in sample table):
ISTD ISTD Amount  Name
#
-----|-----|-----
  1    10.00000    ISP

Signal 1: FID1 A,

RetTime  Lvl  Amount      Area      Amt/Area  Ref Grp Name
 [min] Sig
-----|-----|-----|-----|-----|-----
  5.436  1  5    3.00000    76.22260  3.93584e-2  1    Etanol
                2    9.00000   1533.47156  5.86904e-3
                3   12.00000    729.14520  1.64576e-2
                4   15.00000    608.92896  2.46334e-2
  5.579  1  2   10.00000   1348.56604  7.41528e-3  I1    ISP
                3   10.00000    510.97678  1.95704e-2

Instrument 1 8/8/2019 1:39:31 PM AdeM

```

Continuación del anexo 1.

Method C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOPUNI.M

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
4	10.00000	334.41711	2.99028e-2		
5	10.00000	170.08870	5.87929e-2		

More compound-specific settings:

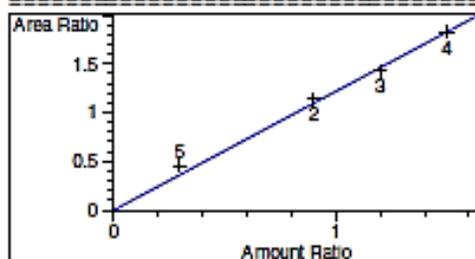
Compound: Etanol
Time Window : From 5.390 min To 5.500 min

Compound: ISP
Time Window : From 5.530 min To 5.719 min

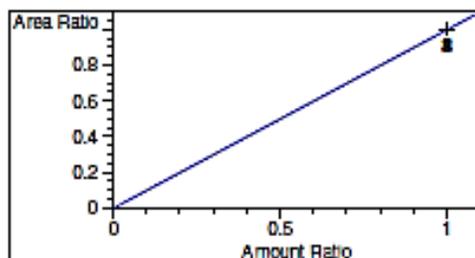
=====
Peak Sum Table
=====

No Entries in table
=====

=====
Calibration Curves
=====



Etanol at exp. RT: 5.436
FID1 A,
Correlation: 0.99929
Residual Std. Dev.: 0.05695
Formula: $y = mx$
m: 1.22037
x: Amount Ratio
y: Area Ratio



ISP at exp. RT: 5.579
FID1 A,
Correlation: 1.00000
Residual Std. Dev.: 0.00000
Formula: $y = mx$
m: 1.00000
x: Amount Ratio
y: Area Ratio

=====
Fuente: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Anexo 2. Cromatografía de gases FID para la muestra L2-1, cáscara de limón con un tiempo de hidrólisis ácida de 2 horas

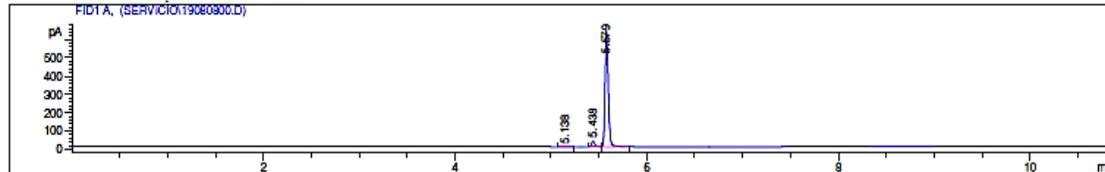
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080800.D

Sample Name: 12-1

Muestra con con 10% ISP

```

=====
Injection Date : 8/8/2019 10:01:31 AM
Sample Name : 12-1
Acq. Operator : AdaM
Acq. Instrument : Instrument 1
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\COGETA.M
Last changed : 8/3/2019 11:32:45 AM by AdaM
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOPUNI.M
Last changed : 8/8/2019 10:35:12 AM by AdaM
Location : -
Inj : 1
Inj Volume : Manually
(mmodified after loading)
Analisis para determinacion de alcoholes,
Columna db - 624 60m 0.53mm ID 3.00um film
Flujo Columna 1.9
Temperatura del inyector: 250 C
Temperatura del horno: 150 C por 3 min, 15 C/Min hasta 210 por 8 min
Detector FID a temperatura de 300C
=====
  
```



Internal Standard Report

```

=====
Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 8/8/2019 10:35:12 AM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 1.00000 [] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Sample ISTD Information:
ISTD ISTD Amount Name
#
-----|-----
1 10.00000 ISP
=====
  
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080800.D

Sample Name: 12-1

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount	Grp	Name
5.438	PV	78.18934	8.19424e-1	4.20522e-1	-1	Etanol
5.579	VB	1523.58789	1.00000	10.00000		ISP

Totals without ISTD(s) : 4.20522e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Anexo 3. Cromatografía de gases FID para la muestra L2-2, cáscara de limón con un tiempo de hidrólisis ácida de 2 horas

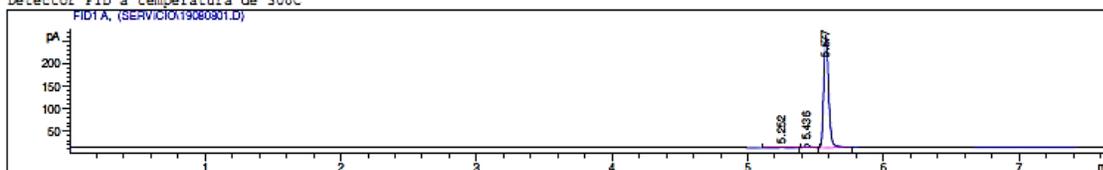
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080801.D

Sample Name: L2-2

Muestra con con 10⁴ ISP

```

=====
Injection Date : 8/8/2019 10:17:10 AM
Sample Name    : L2-2                      Location : -
Acq. Operator  : AdeM                      Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 1              Inj Volume : Manually
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\COGETA.M
Last changed   : 8/3/2019 11:32:45 AM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOPUNI.M
Last changed   : 8/8/2019 10:35:12 AM by AdeM
                (modified after loading)
Análisis para determinación de alcoholes,
Columna db - 624 60m 0.53mm ID 3.00um film
Flujo Columna 1.9
Temperatura del Inyector: 250 C
Temperatura del horno: 150 C por 3 min, 15 C/Min hasta 210 por 8 min
Detector FID a temperatura de 300C
    
```



Internal Standard Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/8/2019 10:35:12 AM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Sample ISTD Information:
ISTD ISTD Amount Name
#
-----|-----|-----
1      10.00000    ISP
    
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080801.D

Sample Name: L2-2

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount	Grp	Name
5.436	PP	20.83140	8.19424e-1	2.71176e-1		Etanol
5.577	BB I	629.46991	1.00000	10.00000		ISP

Totals without ISTD(s) : 2.71176e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Anexo 4. Cromatografía de gases FID para la muestra L2-3, cáscara de limón con un tiempo de hidrólisis ácida de 2 horas

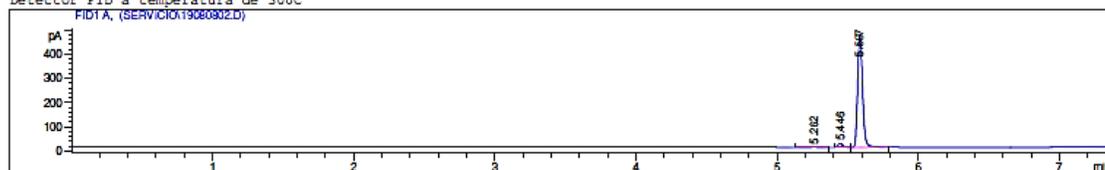
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080802.D

Sample Name: L2-3

Muestra con con 10 μ g ISP

```

=====
Injection Date : 8/8/2019 10:26:09 AM
Sample Name    : L2-3                      Location  : -
Acq. Operator : AdEM                      Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 1             Inj Volume : Manually
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\COGETA.M
Last changed   : 8/3/2019 11:32:45 AM by AdEM
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOPUNI.M
Last changed   : 8/8/2019 10:35:12 AM by AdEM
                (modified after loading)
Analysis para determinacion de alcoholes,
Columna db - 624 60m 0.53mm ID 3.00um film
Flujo Columna 1.9
Temperatura del inyector: 250 C
Temperatura del horno: 150 C por 3 min, 15 C/Min hasta 210 por 8 min
Detector FID a temperatura de 300C
    
```



Internal Standard Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/8/2019 10:35:12 AM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [ ] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Sample ISTD Information:
ISTD ISTD Amount Name
#
-----|-----|-----
1      10.00000   ISP
    
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080802.D

Sample Name: L2-3

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount	Grp	Name
5.446	PV	40.39473	8.19424e-1	2.92629e-1		Etanol
5.587	VB	I 1131.14014	1.00000	10.00000		ISP

Totals without ISTD(s) : 2.92629e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Anexo 5. Cromatografía de gases FID para la muestra L4-1, cáscara de limón con un tiempo de hidrólisis ácida de 4 horas

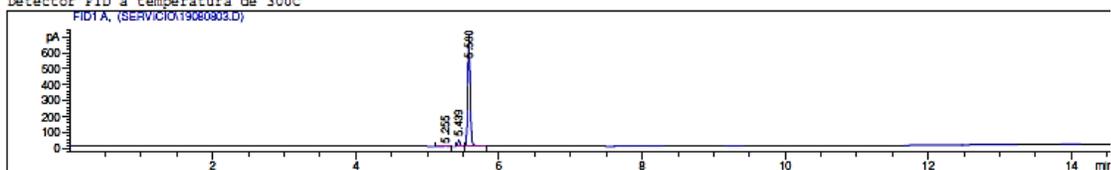
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080803.D

Sample Name: L4-1

Muestra con con 10% ISP

```

=====
Injection Date : 8/8/2019 10:34:46 AM
Sample Name    : L4-1                      Location : -
Acq. Operator  : AdEM                      Inj      : 1
Acq. Instrument: Instrument 1              Inj Volume: Manually
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\COGETA.M
Last changed   : 8/3/2019 11:32:45 AM by AdEM
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOFUNI.M
Last changed   : 8/8/2019 10:35:12 AM by AdEM
              (modified after loading)
Análisis para determinación de alcoholes,
Columna db - 624 60m 0.53mm ID 3.00um film
Flujo Columna 1.9
Temperatura del inyector: 250 C
Temperatura del horno: 150 C por 3 min, 15 C/Min hasta 210 por 8 min
Detector FID a temperatura de 300C
    
```



Internal Standard Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/8/2019 10:35:12 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 1.00000 [] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Sample ISTD Information:
ISTD  ISTD Amount  Name
#
-----|-----|-----
1      10.00000    ISP
    
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080803.D

Sample Name: L4-1

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount	Grp	Name
5.439	BV	101.83138	8.19424e-1	4.86812e-1		Etanol
5.580	VB I	1714.07214	1.00000	10.00000		ISP

Totals without ISTD(s) : 4.86812e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Anexo 6. Cromatografía de gases FID para la muestra L4-2, cáscara de limón con un tiempo de hidrólisis ácida de 4 horas

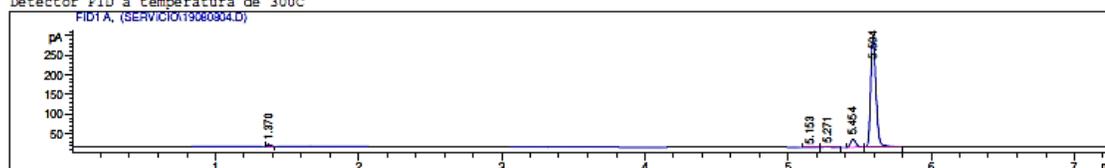
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080804.D

Sample Name: L4-2

Muestra con con 10% ISP

```

=====
Injection Date : 8/8/2019 10:51:49 AM
Sample Name : L4-2
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 1
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\COGETA.M
Last changed : 8/3/2019 11:32:45 AM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOPUNI.M
Last changed : 8/8/2019 10:35:12 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis para determinacion de alcoholes,
Columna db - 624 60m 0.53mm ID 3.00um film
Flujo Columna 1.9
Temperatura del Inyector: 250 C
Temperatura del horno: 150 C por 3 min, 15 C/Min hasta 210 por 8 min
Detector FID a temperatura de 300C
    
```



Internal Standard Report

```

=====
Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 8/8/2019 10:35:12 AM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 1.00000 [] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Sample ISTD Information:
ISTD ISTD Amount Name
#
-----|-----|-----
1 10.00000 ISP
    
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080804.D

Sample Name: L4-2

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount	Grp	Name
5.454	BV	54.63741	8.19424e-1	6.15998e-1		Etanol
5.594	VB I	726.80768	1.00000	10.00000		ISP

Totals without ISTD(s) : 6.15998e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Anexo 7. Cromatografía de gases FID para la muestra L4-3, cáscara de limón con un tiempo de hidrólisis ácida de 4 horas

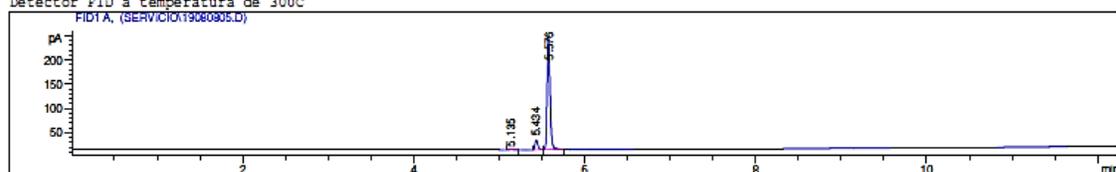
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080805.D

Sample Name: L4-3

Muestra con con 10% ISP

```

=====
Injection Date : 8/8/2019 11:01:50 AM
Sample Name    : L4-3                      Location : -
Acq. Operator  : AdeM                      Inj      : 1
Acq. Instrument: Instrument 1              Inj Volume: Manually
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\COGETA.M
Last changed   : 8/3/2019 11:32:45 AM by AdeM
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOPUNI.M
Last changed   : 8/8/2019 10:35:12 AM by AdeM
                (modified after loading)
Análisis para determinación de alcoholes,
Columna db - 624 60m 0.53mm ID 3.00um film
Flujo Columna 1.9
Temperatura del Inyector: 250 C
Temperatura del horno: 150 C por 3 min, 15 C/Min hasta 210 por 8 min
Detector FID a temperatura de 300C
    
```



Internal Standard Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/8/2019 10:35:12 AM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Sample ISTD Information:
ISTD ISTD Amount Name
#-----
1 10.00000 ISP
    
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080805.D

Sample Name: L4-3

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount	Grp	Name
5.434	PV	46.98550	8.19424e-1	6.89754e-1		Etanol
5.576	VB I	558.18481	1.00000	10.00000		ISP

Totals without ISTD(s) : 6.89754e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Anexo 8. Cromatografía de gases FID para la muestra M2-1, cáscara de mandarina con un tiempo de hidrólisis ácida de 2 horas

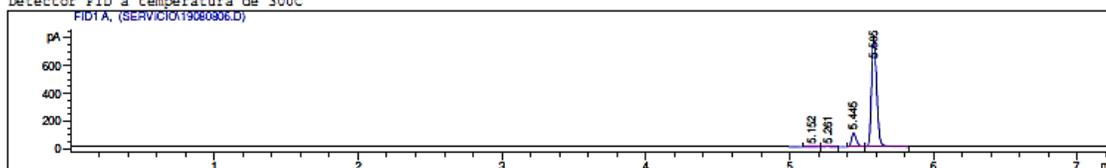
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080806.D

Sample Name: M2-1

Muestra con con 10 μ g ISP

```

=====
Injection Date : 8/8/2019 11:16:39 AM
Sample Name    : M2-1                      Location : -
Acq. Operator  : AdeM                      Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 1              Inj Volume : Manually
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\COGETA.M
Last changed   : 8/3/2019 11:32:45 AM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOPUNI.M
Last changed   : 8/8/2019 10:35:12 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis para determinacion de alcoholes,
Columna db - 624 60m 0.53mm ID 3.00um film
Flujo Columna 1.9
Temperatura del Inyector: 250 C
Temperatura del horno: 150 C por 3 min, 15 C/Min hasta 210 por 8 min
Detector FID a temperatura de 300C
    
```



Internal Standard Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/8/2019 10:35:12 AM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [ ] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Sample ISTD Information:
ISTD ISTD Amount Name
#
-----|-----|-----
1      10.00000   ISP
    
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080806.D

Sample Name: M2-1

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount	Grp	Name
5.445	BV	240.69762	8.19424e-1	9.88652e-1		Etanol
5.585	VB	1994.97180	1.00000	10.00000		ISP

Totals without ISTD(s) : 9.88652e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Anexo 9. Cromatografía de gases FID para la muestra M2-2, cáscara de mandarina con un tiempo de hidrólisis ácida de 2 horas

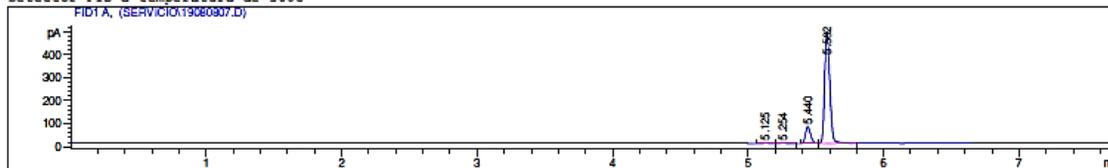
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080807.D

Sample Name: M2-2

Muestra con con 10% ISP

```

=====
Injection Date : 8/8/2019 11:25:19 AM
Sample Name    : M2-2                      Location : -
Acq. Operator  : AdEM                      Inj      : 1
Acq. Instrument: Instrument 1              Inj Volume: Manually
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\COGETA.M
Last changed   : 8/3/2019 11:32:45 AM by AdEM
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOPUNI.M
Last changed   : 8/8/2019 10:35:12 AM by AdEM
                (modified after loading)
Analysis para determinacion de alcoholes,
Columna db - 624 60m 0.53mm ID 3.00um film
Flujo Columna 1.9
Temperatura del Inyector: 250 C
Temperatura del horno: 150 C por 3 min, 15 C/Min hasta 210 por 8 min
Detector FID a temperatura de 300C
    
```



Internal Standard Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calid. Data Modified : 8/8/2019 10:35:12 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 1.00000 [] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Sample ISTD Information:
ISTD  ISTD Amount  Name
#
-----|-----|-----
1      10.00000    ISP
    
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080807.D

Sample Name: M2-2

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount	Grp	Name
5.440	BV	194.57314	8.19424e-1	1.23926		Etanol
5.582	VB	1286.56165	1.00000	10.00000		ISP

Totals without ISTD(s) : 1.23926

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Anexo 10. Cromatografía de gases FID para la muestra M2-3, cáscara de mandarina con un tiempo de hidrólisis ácida de 2 horas

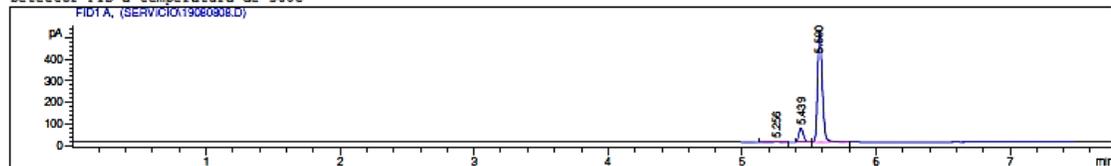
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080808.D

Sample Name: M2-3

Muestra con con 10% ISP

```

=====
Injection Date : 8/8/2019 11:34:15 AM
Sample Name : M2-3 Location : -
Acq. Operator : AdeM Inj : 1
Acq. Instrument : Instrument 1 Inj Volume : Manually
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\COGETA.M
Last changed : 8/3/2019 11:32:45 AM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOPUNI.M
Last changed : 8/8/2019 10:35:12 AM by AdeM
                (modified after loading)
Análisis para determinación de alcoholes,
Columna db - 624 60m 0.53mm ID 3.00um film
Flujo Columna 1.9
Temperatura del Inyector: 250 C
Temperatura del horno: 150 C por 3 min, 15 C/Min hasta 210 por 8 min
Detector FID a temperatura de 300C
    
```



Internal Standard Report

```

=====
Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : 8/8/2019 10:35:12 AM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 1.00000 [] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Sample ISTD Information:
ISTD ISTD Amount Name
#
-----|-----
1 10.00000 ISP
    
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080808.D

Sample Name: M2-3

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount	Grp	Name
5.439	BV	160.12515	8.19424e-1	1.03658		Etanol
5.580	VB I	1265.80383	1.00000	10.00000		ISP

Totals without ISTD(s) : 1.03658

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Anexo 11. Cromatografía de gases FID para la muestra M4-1, cáscara de mandarina con un tiempo de hidrólisis ácida de 4 horas

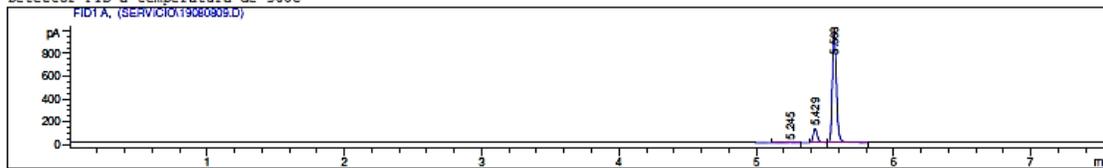
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080809.D

Sample Name: M4-1

Muestra con con 10% ISP

```

=====
Injection Date : 8/8/2019 11:43:26 AM
Sample Name    : M4-1                      Location : -
Acq. Operator  : AdeM                      Inj      : 1
Acq. Instrument: Instrument 1              Inj Volume: Manually
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\COGETA.M
Last changed   : 8/3/2019 11:32:45 AM by AdeM
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOPUNI.M
Last changed   : 8/8/2019 10:35:12 AM by AdeM
                (modified after loading)
Análisis para determinación de alcoholes,
Columna db - 624 60m 0.53mm ID 3.00um film
Flujo Columna 1.9
Temperatura del Inyector: 250 C
Temperatura del horno: 150 C por 3 min, 15 C/Min hasta 210 por 8 min
Detector FID a temperatura de 300C
    
```



Internal Standard Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/8/2019 10:35:12 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 1.00000 [] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Sample ISTD Information:
ISTD  ISTD Amount  Name
#-----|-----|-----
1     10.00000    ISP
    
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080809.D

Sample Name: M4-1

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount	Grp	Name
5.429	BV	263.35864	8.19424e-1	1.03792		Etanol
5.568	VB I	2079.17285	1.00000	10.00000		ISP

Totals without ISTD(s) : 1.03792

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Anexo 12. Cromatografía de gases FID para la muestra M4-2, cáscara de mandarina con un tiempo de hidrólisis ácida de 4 horas

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080810.D

Sample Name: M4-2

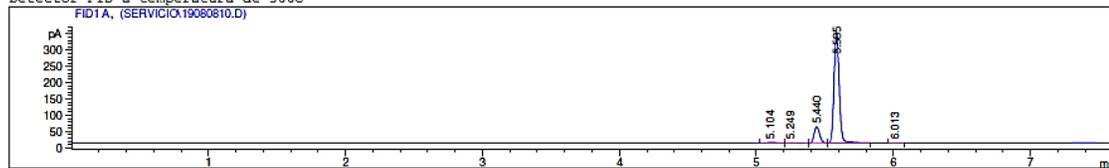
Muestra con con 10% ISP

```

-----
Injection Date : 8/8/2019 11:52:11 AM
Sample Name    : M4-2                      Location   : -
Acq. Operator  : AdeM                      Inj       : 1
Acq. Instrument: Instrument 1              Inj Volume: Manually
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\COGETA.M
Last changed   : 8/3/2019 11:32:45 AM by AdeM
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOPUNI.M
Last changed   : 8/8/2019 10:35:12 AM by AdeM
                (modified after loading)
  
```

```

Análisis para determinación de alcoholes,
Columna db - 624 60m 0.53mm ID 3.00um film
Flujo Columna 1.9
Temperatura del Inyector: 250 C
Temperatura del horno: 150 C por 3 min, 15 C/Min hasta 210 por 8 min
Detector FID a temperatura de 300C
  
```



Internal Standard Report

```

-----
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/8/2019 10:35:12 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 1.00000 [ ] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Sample ISTD Information:
ISTD ISTD Amount Name
#
-----|-----|-----
1      10.00000  ISP
  
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080810.D

Sample Name: M4-2

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount	Grp	Name
5.440	BV	144.83997	8.19424e-1	1.30572		Etanol
5.585	VB	908.96783	1.00000	10.00000		ISP

Totals without ISTD(s) : 1.30572

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Anexo 13. Cromatografía de gases FID para la muestra M4-3, cáscara de mandarina con un tiempo de hidrólisis ácida de 4 horas

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080811.D

Sample Name: M4-3

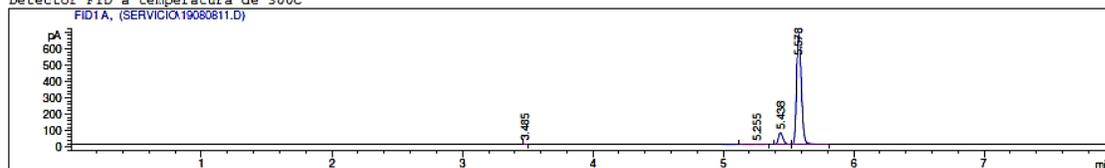
Muestra con con 10% ISP

```

-----
Injection Date : 8/8/2019 12:01:02 PM
Sample Name    : M4-3                      Location : -
Acq. Operator  : AdeM                      Inj      : 1
Acq. Instrument: Instrument 1              Inj Volume: Manually
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\COGETA.M
Last changed   : 8/3/2019 11:32:45 AM by AdeM
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOPUNI.M
Last changed   : 8/8/2019 10:35:12 AM by AdeM
                (modified after loading)
  
```

```

Analisis para determinacion de alcoholes,
Columna db - 624 60m 0.53mm ID 3.00um film
Flujo Columna 1.9
Temperatura del Inyector: 250 C
Temperatura del horno: 150 C por 3 min, 15 C/Min hasta 210 por 8 min
Detector FID a temperatura de 300C
  
```



Internal Standard Report

```

-----
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/8/2019 10:35:12 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 1.00000 [] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Sample ISTD Information:
ISTD  ISTD Amount  Name
#
  
```

```

-----|-----|-----
1      10.00000  ISP
  
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080811.D

Sample Name: M4-3

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount	Grp	Name
5.438	BV	184.39772	8.19424e-1	8.81649e-1		Etanol
5.578	VB I	1713.83313	1.00000	10.00000		ISP

Totals without ISTD(s) : 8.81649e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Anexo 14. Cromatografía de gases FID para la muestra N2-1, cáscara de naranja con un tiempo de hidrólisis ácida de 2 horas

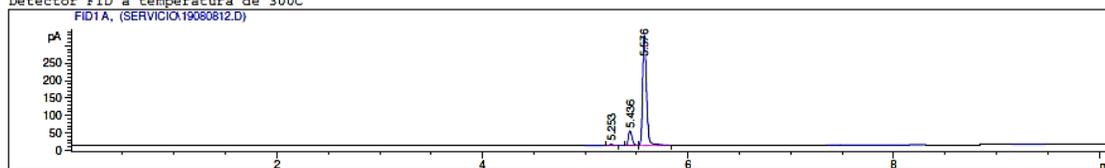
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080812.D

Sample Name: N2-1

Muestra con con 10% ISP

```

-----
Injection Date : 8/8/2019 12:10:19 PM
Sample Name    : N2-1                      Location   : -
Acq. Operator : AdeM                      Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 1             Inj Volume: Manually
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\COGETA.M
Last changed   : 8/3/2019 11:32:45 AM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOPUNI.M
Last changed   : 8/8/2019 10:35:12 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis para determinacion de alcoholes,
Columna db - 624 60m 0.53mm ID 3.00um film
Flujo Columna 1.9
Temperatura del Inyector: 250 C
Temperatura del horno: 150 C por 3 min, 15 C/Min hasta 210 por 8 min
Detector FID a temperatura de 300C
    
```



Internal Standard Report

```

-----
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/8/2019 10:35:12 AM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [ ] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Sample ISTD Information:
ISTD ISTD Amount Name
#
-----|-----|-----
1      10.00000  ISP
    
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080812.D

Sample Name: N2-1

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount	Grp	Name
5.436	BV	110.40061	8.19424e-1	1.08840		Etanol
5.576	VB	831.16937	1.00000	10.00000		ISP

Totals without ISTD(s) : 1.08840

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Anexo 15. Cromatografía de gases FID para la muestra N2-2, cáscara de naranja con un tiempo de hidrólisis ácida de 2 horas

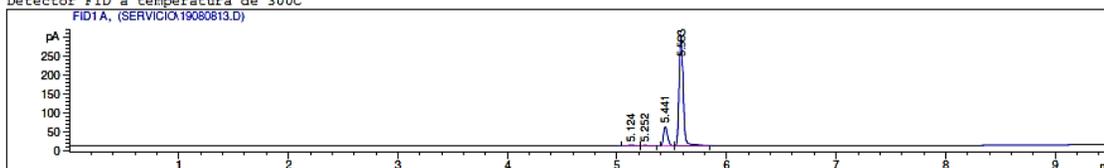
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080813.D

Sample Name: N2-2

Muestra con con 10% ISP

```

-----
Injection Date : 8/8/2019 12:22:42 PM
Sample Name    : N2-2                      Location : -
Acq. Operator  : AdeM                      Inj      : 1
Acq. Instrument: Instrument 1              Inj Volume: Manually
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\COGETA.M
Last changed   : 8/3/2019 11:32:45 AM by AdeM
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOPUNI.M
Last changed   : 8/8/2019 10:35:12 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis para determinacion de alcoholes,
Columna db - 624 60m 0.53mm ID 3.00um film
Flujo Columna 1.9
Temperatura del Inyector: 250 C
Temperatura del horno: 150 C por 3 min, 15 C/Min hasta 210 por 8 min
Detector FID a temperatura de 300C
  
```



Internal Standard Report

```

-----
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/8/2019 10:35:12 AM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Sample ISTD Information:
ISTD ISTD Amount Name
#
-----|-----|-----
1      10.00000    ISP
  
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080813.D

Sample Name: N2-2

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount	Grp	Name
5.441	BV	132.62842	8.19424e-1	1.41225		Etanol
5.833	VB I	769.54193	1.00000	10.00000		ISP

Totals without ISTD(s) : 1.41225

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Anexo 16. Cromatografía de gases FID para la muestra N2-3, cáscara de naranja con un tiempo de hidrólisis ácida de 2 horas

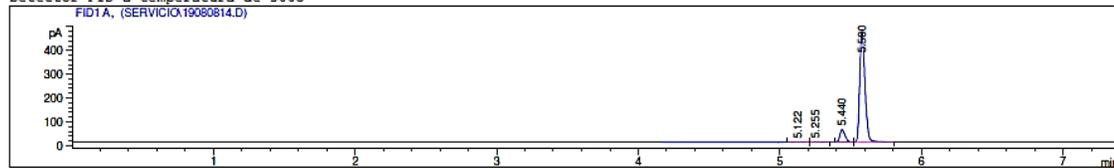
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080814.D

Sample Name: N2-3

Muestra con con 10% ISP

```

-----
Injection Date : 8/8/2019 12:34:23 PM
Sample Name    : N2-3                      Location   : -
Acq. Operator : AdeM                      Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 1             Inj Volume : Manually
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\COGETA.M
Last changed   : 8/3/2019 11:32:45 AM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOPUNI.M
Last changed   : 8/8/2019 10:35:12 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis para determinacion de alcoholes,
Columna db - 624 60m 0.53mm ID 3.00um film
Flujo Columna 1.9
Temperatura del Inyector: 250 C
Temperatura del horno: 150 C por 3 min, 15 C/Min hasta 210 por 8 min
Detector FID a temperatura de 300C
    
```



Internal Standard Report

```

-----
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/8/2019 10:35:12 AM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Sample ISTD Information:
ISTD ISTD Amount Name
#
-----|-----|-----
1      10.00000   ISP
    
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080814.D

Sample Name: N2-3

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount	Grp	Name
5.440	BV	138.53801	8.19424e-1	9.41127e-1		Etanol
5.580	VB	I 1206.22803	1.00000	10.00000		ISP

Totals without ISTD(s) : 9.41127e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Anexo 17. Cromatografía de gases FID para la muestra N4-1, cáscara de naranja con un tiempo de hidrólisis ácida de 4 horas

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080815.D

Sample Name: N4-1

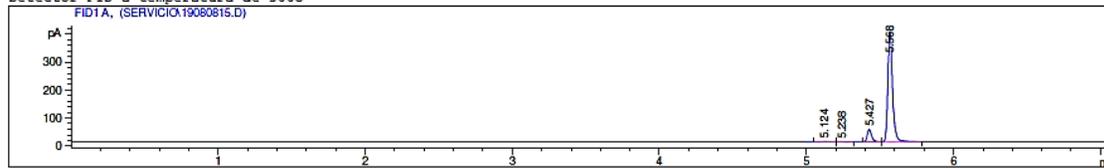
Muestra con con 10% ISP

```

-----
Injection Date : 8/8/2019 12:43:53 PM
Sample Name    : N4-1                      Location   : -
Acq. Operator : AdeM                      Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 1             Inj Volume: Manually
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\COGETA.M
Last changed   : 8/3/2019 11:32:45 AM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOPUNI.M
Last changed   : 8/8/2019 10:35:12 AM by AdeM
                (modified after loading)
  
```

```

Analisis para determinacion de alcoholes,
Columna db - 624 60m 0.53mm ID 3.00um film
Flujo Columna 1.9
Temperatura del Inyector: 250 C
Temperatura del horno: 150 C por 3 min, 15 C/Min hasta 210 por 8 min
Detector FID a temperatura de 300C
  
```



Internal Standard Report

```

-----
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/8/2019 10:35:12 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 1.00000 [] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Sample ISTD Information:
ISTD  ISTD Amount  Name
#
-----|-----|-----
1      10.00000    ISP
  
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080815.D

Sample Name: N4-1

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount	Grp	Name
5.427	BV	97.69809	8.19424e-1	9.08979e-1		Etanol
5.568	VB I	880.72565	1.00000	10.00000		ISP

Totals without ISTD(s) : 9.08979e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Anexo 10. Cromatografía de gases FID para la muestra N4-2, cáscara de naranja con un tiempo de hidrólisis ácida de 4 horas

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080816.D

Sample Name: N4-2

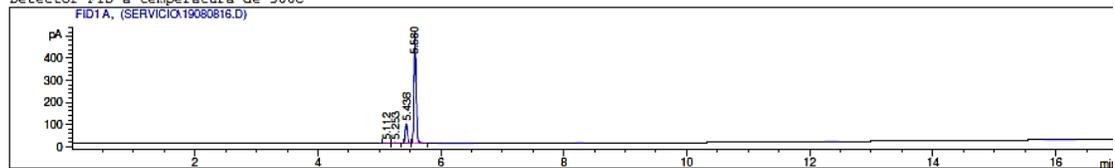
Muestra con con 10% ISP

```

-----
Injection Date : 8/8/2019 12:53:40 PM
Sample Name    : N4-2                      Location   : -
Acq. Operator : AdeM                      Inj        : 1
Acq. Instrument : Instrument 1             Inj Volume : Manually
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\COGETA.M
Last changed   : 8/3/2019 11:32:45 AM by AdeM
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOPUNI.M
Last changed   : 8/8/2019 10:35:12 AM by AdeM
                (modified after loading)
  
```

```

Análisis para determinación de alcoholes,
Columna db - 624 60m 0.53mm ID 3.00um film
Flujo Columna 1.9
Temperatura del Inyector: 250 C
Temperatura del horno: 150 C por 3 min, 15 C/Min hasta 210 por 8 min
Detector FID a temperatura de 300C
  
```



Internal Standard Report

```

-----
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/8/2019 10:35:12 AM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Sample ISTD Information:
ISTD ISTD Amount Name
#
-----|-----|-----
1      10.00000   ISP
  
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080816.D

Sample Name: N4-2

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount	Grp	Name
5.438	BV	233.59358	8.19424e-1	1.51287		Etanol
5.580	VB	I 1265.22144	1.00000	10.00000		ISP

Totals without ISTD(s) : 1.51287

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Anexo 19. Cromatografía de gases FID para la muestra N4-3, cáscara de naranja con un tiempo de hidrólisis ácida de 4 horas

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080817.D

Sample Name: N4-3

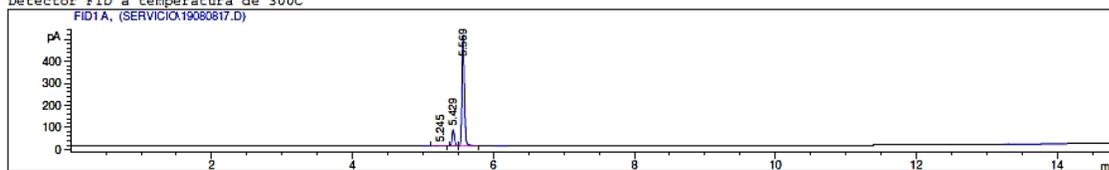
Muestra con con 10% ISP

```

-----
Injection Date : 8/8/2019 1:18:25 PM
Sample Name    : N4-3                      Location   : -
Acq. Operator  : AdeM                      Inj        : 1
Acq. Instrument: Instrument 1              Inj Volume: Manually
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\COGETA.M
Last changed   : 8/3/2019 11:32:45 AM by AdeM
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\ETOPUNI.M
Last changed   : 8/8/2019 10:35:12 AM by AdeM
                (modified after loading)
  
```

```

Análisis para determinación de alcoholes,
Columna db - 624 60m 0.53mm ID 3.00um film
Flujo Columna 1.9
Temperatura del Inyector: 250 C
Temperatura del horno: 150 C por 3 min, 15 C/Min hasta 210 por 8 min
Detector FID a temperatura de 300C
  
```



Internal Standard Report

```

-----
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 8/8/2019 10:35:12 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 1.00000 [] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Sample ISTD Information:
ISTD ISTD Amount Name
#
-----
1 10.00000 ISP
  
```

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SERVICIO\19080817.D

Sample Name: N4-3

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount	Grp	Name
5.429	BV	179.92099	8.19424e-1	1.19016		Etanol
5.569	VB	1238.75732	1.00000	10.00000		ISP

Totals without ISTD(s) : 1.19016

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, UVG.

Anexo 20. Informe de resultados del ensayo de Benedict



Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
Laboratorio de Investigación de Productos Naturales
LIPRONAT

1/4

Informe No. 001-100819

INFORME DE RESULTADOS

Actividad solicitada: Realización de lixiviación sólido-líquido y determinación de azúcares de la cáscara de *Citrus sinensis* L. Osbeck, *Citrus latifolia* y *Citrus reticulata*.

Solicitante: Luis Us, estudiante de Ingeniería Química.

Fecha de solicitud: Junio de 2019

MÉTODOS

Hidrólisis ácida: Se colocaron 50 g de cáscara de naranja, limón y mandarina cada una dentro en un balón, a los cuales se agregaron 500 mL de ácido sulfúrico al 4% y se realizó una maceración dinámica con reflujo variando la cantidad de tiempo por muestra, siendo de 2 y 4 horas.

Determinación de azúcares con reactivo de Benedict: Se midieron 2 mL de la solución obtenida a partir de la cáscara de naranja, limón y mandarina, se les agregaron 0.1 mL del reactivo de Benedict y se calentó en baño maría por 5 minutos. La formación de precipitado amarillo o rojizo, indica que la prueba es positiva para carbohidratos reductores.

RESULTADOS

En la tabla 1 se presentan los resultados de la determinación de azúcares a la solución obtenida de la hidrólisis ácida de cáscara de naranja, limón y mandarina.

Tabla 1. Determinación de azúcares

Cítrico	Tiempo (Horas)	Repetición		
		Primera	Segunda	Tercera
Naranja	2	+	+	+
	4	+	+	+
Limón	2	+	+	+
	4	+	+	+
Mandarina	2	+	+	+
	4	+	+	+
Estándares	Xilosa	+		
	Arabinosa	+		
	Fucosa	+		
	Ramnosa	+		
	Glucosa	+		

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales – LIPRONAT-, laboratorio 106, edificio T10, USAC.

2/4



DISCUSIÓN

El ensayo de Benedict permite el reconocimiento de carbohidratos reductores debido a que contiene el ión cúprico en medio alcalino que se reduce hasta óxido cuproso en presencia de azúcares con el hidroxilo hemiacetalítico libre (Departamento de Ciencias Básicas, s.f.; Iqbal et al., 2019; Teja et al., 2016). En el ensayo de Benedict todos los lixiviados dieron positivo indicando la presencia de azúcares reductores.

CONCLUSIONES

- Los lixiviados de cáscara de naranja, limón y mandarina dieron positivo para azúcares reductores por medio del ensayo de Benedict.

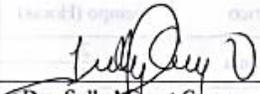
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Departamento de Ciencias Básicas. (S.f). *Guía No7: Reconocimiento y diferenciación de carbohidratos*. Bogotá: Universidad de Bogotá.

Iqbal, S., Arifeen, S., Akbar, A., Zahoor, S., Maher, S., Khan, N., ... & Sajjad, A. (2019). 76. Phytochemical screening and antibacterial assay of the crude extract and fractions of *Ferula oopoda*. *Pure and Applied Biology (PAB)*, 8(1), 742-749.

Teja, M., Ramya, B., Reddy, S. M., Sudha, G. J., Janaki, B., Rama, S., & Kumar, S. A. R. (2016). Preliminary phytochemical evaluation of *Caesalpinia sappan saraca indica*. *International Journal Research Pharmaceutical Chemistry*, 6(1).



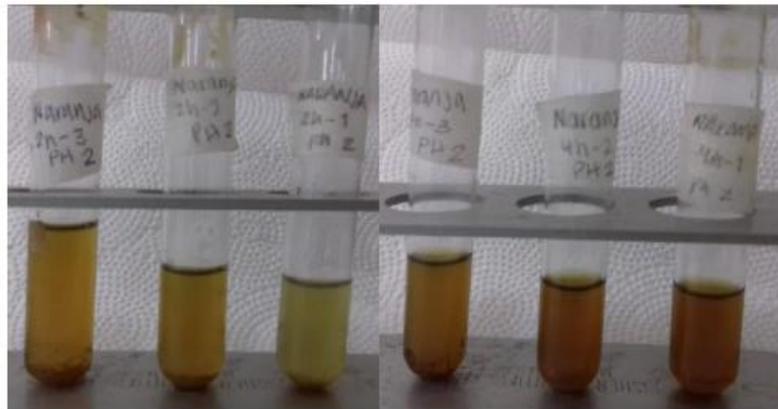
 Lorena Rochac Analista	 Dra. Sully Marget Cruz Coordinadora
Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT)	
Queda prohibida la reproducción total o parcial de este informe de resultados sin previa autorización.	
-----FIN-----	

Continuación del anexo 20.

3/4

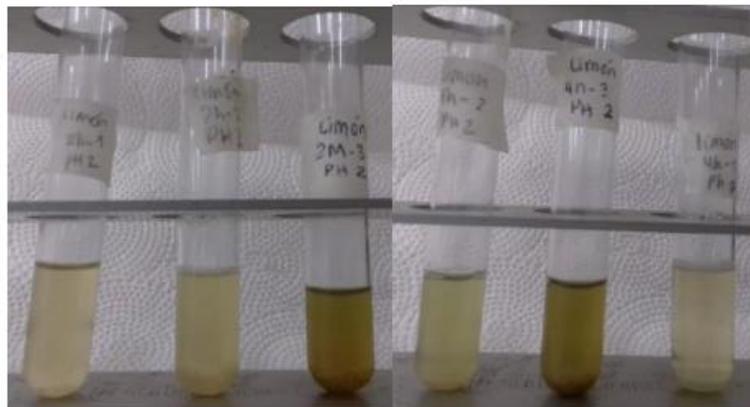
ANEXOS

Anexo 1 Determinación de azúcares en naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) por el ensayo de Benedict.



Fuente. Fotografía tomada en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT-, Edificio T-10, Laboratorio 106, USAC.

Anexo 2 Determinación de azúcares en limón (*Citrus latifolia*) por el ensayo de Benedict.

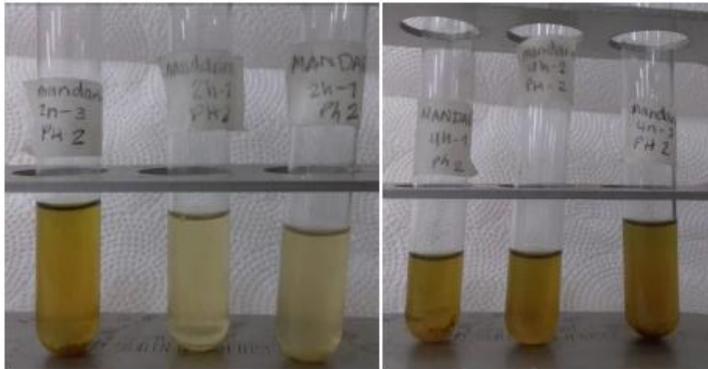


Fuente. Fotografía tomada en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT-, Edificio T-10, Laboratorio 106, USAC.

Continuación del anexo 20.

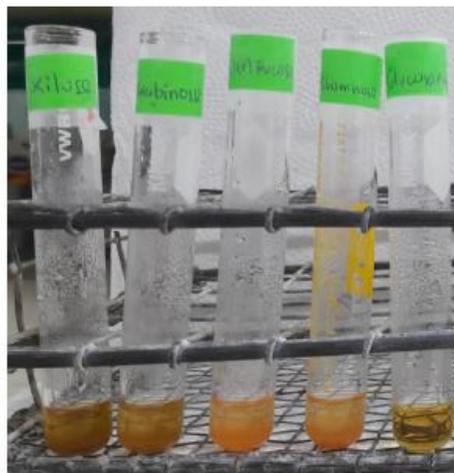
4/4

Anexo 3 Determinación de azúcares en mandarina (*Citrus reticulata*) por el ensayo de Benedict.



Fuente. Fotografía tomada en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT-. Edificio T-10, Laboratorio 106, USAC.

Anexo 3 Ensayo de Benedict en controles positivos de diversos azúcares.



Fuente. Fotografía tomada en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT-. Edificio T-10, Laboratorio 106, USAC.

Fuente: Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala