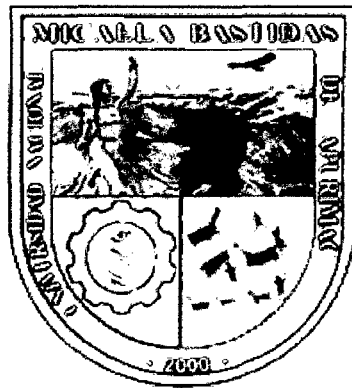


**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE
APURÍMAC**

FACULTAD DE INGENIERÍA

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**



EXTRACCIÓN DE FIBRA A PARTIR DE LAS HOJAS DEL *Agave*

***americana* L. POR DIFERENTES MÉTODOS PARA LA**

OBTENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO

AGROINDUSTRIAL

EDISON ALTAMIRANO GUTIERREZ

Abancay, mayo del 2013

PERÚ

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS
APURIMAC
BIBLIOTECA CENTRAL
FECHA INGRESO: 13 SEP 2013
Nº: 00325

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA
BASTIDAS DE APURÍMAC**

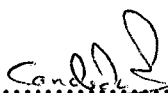
FACULTAD DE INGENIERÍA

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**

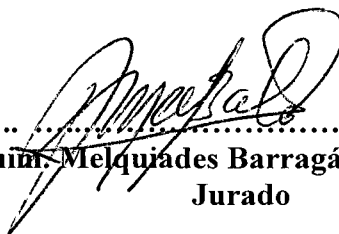
Jurado Calificador Integrado Por:



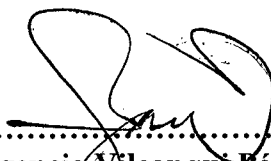
.....
Ing. Alfredo Fernández Ayma
Presidente



.....
Lic. Candida López Loayza
Jurado



.....
Quim. Melquiades Barragán Condori
Jurado



.....
Ing. Fulgencio Vilcanqui Pérez
Asesor

EXTRACCIÓN DE FIBRA A PARTIR DE LAS HOJAS DEL
***Agave americana* L. POR DIFERENTES MÉTODOS PARA LA**
OBTENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida y oportunidad de llegar a este gran momento y llenarme de espíritu motivador en los momentos más difíciles.

A mis padres Víctor Altamirano Fernández y Maximiliana Gutiérrez Paccha, quienes me dieron su apoyo incondicional y paciencia inagotable e espíritu incansable en la ejecución de la presente investigación.

AGRADECIMIENTO

- A mi asesor Ing. Fulgencio Vilcanqui Perez, por el apoyo incondicional durante todo el desarrollo de la investigación y consejos acertados para la elaboración del informe de la presente investigación.
- Al MVZ. Ludwig Cárdenas, por su apoyo incondicional en el manejo del espectrofotómetro y acertadas orientaciones y motivación en este camino de la investigación.
- A mi amigo y compañero José Días Pillaca por brindarme su amistad y oportunos aportes durante todo el desarrollo de la investigación.
- A los miembros del jurado calificador.
- Al Ing. Justo Arias por compartir su conocimiento y apoyo técnico en la investigación.
- Al centro de investigación de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, por brindarme el apoyo económico para la ejecución de la investigación.
- A mi tío Víctor Gutiérrez Paccha, por sus consejos y apoyo moral incansable durante todo el desarrollo de la investigación.
- Y como olvidar con los que compartimos conocimientos durante el proceso experimental en los laboratorios de la Universidad, mis grandes amigos Roger, Ronal, Víctor, Edwin, Braulio que han hecho de mí una mejor persona, conocedora y esforzada, tolerante y empática les agradezco todos los buenos momentos que pasamos.
- Finalmente, agradecer a la Universidad nacional Micaela Bastidas de Apurímac por estos lindos y satisfactorios 5 años de mi vida.

ABREVIATURAS

Acido 3,5 dinitrosalicilico	DNS
Azúcares reductores	AR
Azúcares reductores totales	ART
Energía renovable nacional	NREL
Fibra detergente ácida	FDA
Fibra detergente neutra	FDN
Fibra insoluble	FI
Fibra soluble	FS
Hidroximetil furfural	HMF
Lignina detergente ácida	LDA
Norma técnica peruana	NTP
Pretratamiento de agua caliente liquida	LHW
Explosión de fibra de amoniaco	AFEX

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	XVI
ABSTRAC	XVIII
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Aspectos generales del maguey (<i>Agave americana</i>)	3
2.2 Componentes químicos de las fibras de <i>Agave</i>	5
2.3 Componentes de la biomasa lignocelulosica.....	5
2.3.1 Celulosa.....	7
2.3.2 Hemicelulosa.....	8
2.3.3 Lignina	10
2.3.4 Extractivos	11
2.4 Pretratamiento para el proceso de extracción.....	11
2.4.1 Pretratamiento de extracción física.....	13
2.4.1.1 Pretratamiento mecánico	14
2.4.1.2 Radiación de alta energía	14
2.4.2 Pretratamiento de extracción fisicoquímico.....	14
2.4.2.1 Explosión de vapor.....	15
2.4.2.2 Agua caliente líquida (LHW).....	16
2.4.2.3 Explosión de fibra de amoníaco (AFEX).....	17
2.4.2.4 Dióxido de carbono (CO ₂).....	17
2.4.3 Pretratamiento de extracción química.....	18
2.4.3.1 Pretratamiento con ácido.....	18

2.4.3.2 Pretratamiento alcalino.....	19
2.4.4 Pretratamiento de extracción biológico	20
2.5 Hidrólisis	20
2.5.1 Tipos de hidrólisis.....	22
2.5.1.1 Hidrólisis de ácido diluido.....	23
2.5.1.2 Hidrolisis de ácido concentrado.....	24
2.6 Subproductos de la hidrolisis de biomasa lignocelulosica	25
2.6.1 Ácidos orgánicos.....	26
2.6.2 Compuestos furanos.....	26
2.7 Hidrato de carbono y azúcares reductores.....	27
2.7.1 Hidratos de carbono	27
2.7.2 Azúcares reductores (AR).....	27
2.7.2.1 Método de análisis para la determinación de azúcar reductor.....	28
2.7.2.1.1 Método de ácido 3, 5- dinitrosalicílico (DNS).....	28
2.8 Métodos detergentes para determinación de fibra.....	29
III. PARTE EXPERIMENTAL	30
3.1 Lugar de ejecución.....	30
3.2 Materia prima	30
3.3 Equipos, materiales, reactivos y utensilios.....	30
3.3.1 Equipos	30
3.3.2 Materiales.....	31
3.3.3 Reactivos.....	32
3.3.4 Utensilios	33
3.3.5 Indumentaria.	33

3.4 Población y Muestra	34
3.5 Técnicas e Instrumentos de Análisis.....	34
3.5.1 Análisis químico a la fibra extraída de las hojas del <i>Agave americana</i>	34
3.5.1.1 Determinación de humedad por el método gravimétrico	34
3.5.1.2 Cuantificación de fibra detergente neutra (FDN).....	34
3.5.1.3 Cuantificación de fibra detergente ácida (FDA)	35
3.5.1.4 Lignina detergente ácida (LDA).....	35
3.5.1.5 Análisis químico después del proceso de hidrólisis ácida.....	35
3.5.1.5.1 Azúcares reductores (AR)	35
3.6 Método de experimentación	36
3.6.1 Hojas de <i>Agave americana</i>	38
3.6.2 Lavado.....	38
3.6.3 Cortado.....	38
3.6.4 Pelado.....	38
3.6.5 Picado I.	39
3.6.6 Licuado	39
3.6.7 Extracción de la fibra por métodos diferentes	39
3.6.7.1 Extracción por el método I	39
3.6.7.2 Extracción por método II.....	40
3.6.8 Filtrado.....	41
3.6.9 Secado	41
3.6.10 Picado II	41
3.6.11 Molienda	41
3.6.12 Envasado	42

3.6.13 Cuantificación de FDN, FDA y LDA	42
3.6.14 Selección de tratamiento	42
3.6.15 Hidrólisis ácida	43
3.6.15.1 Detoxificación	43
3.6.16 Determinación de azúcares reductores.....	44
3.7 Diseño estadístico	44
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
4.1 Extracción de la fibra de <i>Agave americana</i> por diferentes métodos	46
4.1.1 Concentración de la fibra extraída por el método I (hidrotérmico)	46
4.1.2 Concentración de la fibra extraída por el método II (expansión por explosión).....	49
4.2 Selección de tratamientos en los diferentes métodos de extracción	52
4.2.1 Selección del tratamiento en el método I (hidrotérmico).....	52
4.2.2 Selección del tratamiento en el método II (expansión por explosión).....	55
4.3 Hidrolisis ácida diluida al tratamiento seleccionado de extracción hidrotérmica y expansión por explosión	59
4.3.1 Hidrolisis ácida diluida al tratamiento seleccionado del proceso de extracción hidrotérmica.	59
4.3.2 Hidrolisis ácida diluida al tratamiento seleccionado del proceso de extracción de expansión por explosión.....	63
4.4 Comparación de los métodos de extracción hidrotérmica y expansión por explosión.....	70

V. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES	72
5.1 Conclusión.....	72
5.2 Recomendaciones	73
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	74
ANEXOS.....	85

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 01. Clasificación taxonómica del maguey (<i>Agave americana</i>)	3
Tabla 02. Principales compuestos del la biomasa lignocelulosica.	6
Tabla 03. Contenido lignocelulosico en distintas materias primas.	7
Tabla 04. Solubilización de los componentes lignocelulosicos después de los pretratamientos	13
Tabla 05. Preparación macro y micro de la curva estándar de glucosa.....	28
Tabla 06. Diseño factorial de (2x2x2) para la extracción hidrotérmico.....	45
Tabla 07. Diseño factorial (2x2x2) para la extracción de expansión por explosión.....	45
Tabla 08. Diseño factorial de (3x3) para la hidrolisis ácida tanto para el tratamiento de expansión por explosión e hidrotérmico.....	45
Tabla 09. Resultados de la fibra del <i>Agave americana</i> después del tratamiento hidrotérmico.....	46
Tabla 10. Resultados de la fibra del <i>Agave americana</i> después del tratamiento por explosión por expansión.....	49
Tabla 11. Análisis químico a la fibra de <i>Agave americana</i> después del tratamiento hidrotérmico.....	54
Tabla 12. Análisis químico de la fibra de <i>Agave americana</i> después del tratamiento de expansión por explosión.	56
Tabla 13. Obtención de azúcares reductores por hidrolisis ácida diluida después de la extracción hidrotérmico.....	59
Tabla 14. Obtención de azúcares reductores por hidrolisis ácida diluida después de la extracción por expansión por explosión.	64

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 01. <i>Agave americana</i>	4
Figura 02. Estructura de una fibra lignocelulósica.....	5
Figura 03. Estructura de la celulosa.....	8
Figura 04. Estructura básica de la hemicelulosa.....	9
Figura 05. Monómeros de lignina.....	10
Figura 06. Pretratamiento en la conversión de biomasa.....	12
Figura 07. Productos catalizados por la hidrólisis acida.....	22
Figura 08. Reacciones producidas durante la hidrolisis de materiales lignocelulósicos	25
Figura 09. Reacción del ácido 3, 5 dinitrosalicílico	29
Figura 10. Diagrama de flujo para el desarrollo experimental de la extracción de fibra a partir de las hojas del <i>Agave americana</i> por diferentes métodos para la obtención de azúcares reductores.....	37
Figura 11. Resultados del tratamiento seleccionado en el método hidrotérmico	48
Figura 12. Resultados del tratamiento seleccionado por el método de expansión por explosión.....	51
Figura 13. Comparación estadística al método hidrotérmico en función a la FDN	53
Figura 14. Comparación estadística a los tratamientos de expansión por explosión en función al %FDN.....	56
Figura 15. Comparación estadística de azúcares reductores después del proceso de hidrólisis anteriormente extraídas por el método hidrotérmico.....	63
Figura 16. Comparación estadística de azúcares reductores después del proceso de hidrólisis anteriormente extraídas por el método de expansión por explosión.....	69

Figura 17. Comparación de la extracción hidrotérmica y expansión por explosión.	70
Figura 18. Comparación de AR en los métodos de extracción hidrotérmica y expansión por explosión.....	71

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 01: Determinación de humedad (Método gravimétrico).....	86
Anexo 02: Método de fibra detergente neutra (FDN)	87
Anexo 02.1: Resultados de FDN por el método hidrotérmico	91
Anexo 02.1.1: ANOVA factorial – fibra detergente neutra (FDN) para el método hidrotérmico.....	92
Anexo 02.2: Resultados de FDN por el método de expansión por explosión.....	94
Anexo 02.2.1: ANOVA factorial – fibra detergente neutra (FDN) para el método de expansión por explosión.....	95
Anexo 03: Método de fibra detergente ácida (FDA).....	96
Anexo 03.1: Resultados de FDA por el método hidrotérmico	99
Anexo 03.1.1: ANOVA factorial – Fibra detergente ácida (FDA) para el método hidrotérmico.....	100
Anexo 03.2.: Resultados de FDA por el método de expansión por explosión.....	102
Anexo 03.2.1: ANOVA factorial – Fibra detergente ácida (FDA) para el método de expansión por explosión.....	103
Anexo 04: Método lignina detergente ácida (LDA).....	104
Anexo 04.1: Resultados de LDA por el método hidrotérmico	107
Anexo 04.1.1: ANOVA factorial – Lignina detergente ácida (LDA) para el método hidrotérmico.....	108
Anexo 04.2: Resultados de LDA por el método de expansión por explosión.....	110
Anexo 04.2.1: ANOVA factorial – Lignina detergente ácida (LDA) para el método de expansión por explosión	111

Anexo 05: Resultados de la celulosa y hemicelulosa después del tratamiento hidrotérmico.....	113
Anexo 06: Resultados de la celulosa y hemicelulosa después del tratamiento de expansión por explosión.....	115
Anexo 07: Determinación de azúcares reductores (AR).....	117
Anexo 07.1: Resultados de los azúcares reductores (AR) en el método hidrotérmico	121
Anexo 07.1.1: ANOVA factorial – Azúcar reductor (AR) para el método hidrotérmico.....	123
Anexo 07.2: Resultados de los azúcares reductores (AR) del método de expansión por explosión.....	124
Anexo 07.2.1: ANOVA factorial – Azúcar reductor (AR) para el método de expansión por explosión.....	126
Anexo 08: Comparación de medias en los tratamientos de mayor rendimiento de azúcares reductores durante la hidrólisis ácida en los métodos hidrotérmico y expansión por explosión.....	128
Anexo 09: Fotografías del estudio de investigación.....	129

RESUMEN

El desarrollo de la presente investigación se llevó a cabo en dos etapas; la primera etapa consistió en estudiar dos diferentes métodos de extracción método I (hidrotérmico) y método II (expansión por explosión) siendo las condiciones de estudio para el método hidrotérmico de 10, 15 minutos, temperaturas 80, 90 °C, relación M:H₂O de (1:1, 1:2) (p/v) y en el método de extracción de expansión por explosión se estudiaron a las variables de presión 110, 130 psi, humedad 53, 62% y peso de la materia prima 90, 110 g; de tal manera que en cada método de extracción se seleccione al mejor tratamiento en función a la variable de respuesta de FDN.

Por otro lado se reportaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en los tratamientos de extracción hidrotérmica y expansión por explosión; de forma que se aplicó la comparación múltiple de medias (Tukey) en el método I cuyo valor más alto de FDN se obtuvo en el tratamiento uno la que no difirió estadísticamente ($p < 0.05$) de los tratamientos dos y tres de los cuales se seleccionó el tratamiento tres con las variables de 90 °C, 10 minutos, y relación materia prima agua 1:2 (p/v) quien alcanzó un rendimiento de FDN de 67.83 %; por otro lado en el método de expansión por explosión el tratamiento cuatro fue el de mayor rendimiento con 58.60% de FDN con las variables de presión 110 Psi, peso 90 g y 53% de humedad difiriendo estadísticamente de los demás tratamientos estos resultados se seleccionaron para el proceso de la hidrólisis ácida.

En la segunda etapa, se realizó una hidrólisis ácida a los tratamientos seleccionados con mayor concentración de FDN tanto como para el método hidrotérmico y expansión por explosión, donde las variables de estudio en la hidrólisis fueron tiempos de 30, 60, 90 minutos y concentraciones de 2, 4, 8 % de

(H₂SO₄) a una temperatura constante de 121 °C, las que se evaluaron en función a la concentración de azúcares reductores (AR).

Al realizar un análisis de varianza (ANOVA) a los resultados de los azúcares reductores después del proceso de hidrólisis ácida en ambos métodos de extracción, se reportaron diferencias significativas entre tratamientos a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ de forma que se pasó a aplicar la comparación múltiple de medias en donde los resultados más altos de azúcares reductores después del tratamiento hidrotérmico fue 9.28, 9.18, 8.95 g/L y en el método de expansión por explosión 9.41, 9.24, 9.24 g/L; las que no difirieron estadísticamente ($p < 0.05$).

El tratamiento de mayor resultado fue el tratamiento tres después del proceso de hidrólisis ácida tanto como para el método hidrotérmico y expansión por explosión resultando 9.28 g/L y 9.41 g/L de azúcares reductores (AR) equivalentes a 27.84 % y 28.23 % respectivamente a condiciones de 30 minutos y a una concentración de 8% H₂SO₄ y una relación de (M: H₂SO₄) 1:30 p/v.

En los métodos de extracción hidrotermica, expansión por explosión e hidrólisis ácida se utilizó el diseño factorial; las que permitieron determinar los efectos de temperatura, tiempo y relación en el método hidrotérmico; presión, porcentaje de humedad y peso en método de expansión por explosión en función a la concentración de FDN. Mientras en la hidrólisis ácida se evaluó los efectos de tiempo y concentración de ácido en relación a la concentración de azúcares reductores (AR) en ambos métodos de extracción.

Palabras Claves: Pretratamiento hidrólisis, hidrotermico, expansión por explosión, azúcar reductor, fibra.

SUMMARY

The development of the present investigation was carried out in two stages; the first stage consisted of studying two different methods of extraction method I (hidrotérmico) and method II (expansion for explosion) being the study conditions for the method hidrotérmico of 10, 15 minutes, temperatures 80, 90 °C, relation M:H₂O of (1:1, 1:2) (p/v) and in the method of extraction of expansion by explosion 110, 130 were studied to the pressure variables psi, moisture 53, 62 % and weight of the raw material 90, 110 g; in such a way that in every extraction method it is selected to the best treatment in function to the variable of answer of FDN.

On the other hand $\alpha=0.05$ brought significant differences (α) in the treatments of hidrotérmica extraction and expansion for explosion; so that the multiple comparison of averages (Tukey) was applied in the method I whose higher value of FDN obtained in the treatment one the one that did not defer as per statistics ($p < 0.05$) of the treatments two and three of which selected the treatment three with the variables of 90 °C, 10 minutes, and relation raw material waters down 1:2 (p/v) the one who reached a yield of FDN of 67.83 %; on the other hand in the expansion method for explosion the treatment four was that of major yield with 58.60 % of FDN with the variables of pressure 110 Psi, he weighed 90 g and 53 % of moisture deferring as per statistics of other treatments these results was selected for the process of the acidic hidrolisis.

In the second stage, an acidic hidrolisis realized to the treatments selected with major concentration of FDN so much how for the hidrotérmico method and expansion for explosion, where the study variables in the hidrólisis were times of 30,

60, 90 minutes and concentrations of 2, 4, 8 % of (H₂SO₄) to a constant temperature of 121 °C, which evaluated in function to the sugar concentration differentials (AR).

After differentials realized an analysis of variance (ANOVA) to the results of the sugar after the process of acidic hidrolisis in both extraction methods, 0.05 brought significant differences between treatments at a significancia level of $\alpha =$ so that one happened to apply the multiple comparison of averages where the highest results of sugar differentials after the treatment hidrotérmico was 9.28, 9.18, 8.95 g/L and in the expansion method for explosion 9.41, 9.24, 9.24 g/L; those who did not defer as per statistics ($p < 0.05$).

The treatment of major result was the treatment three after the process of acidic hidrolisis so much how for the hidrotérmico method and expansion for explosion turning out to be 9.28 g/L and 9.41 g/L of sugar differentials (AR) equivalent to 27.84 % and 28.23 % respectively to conditions of 30 minutes and to a concentration of 8 % H₂SO₄ and a relation of (M: H₂SO₄) 1:30 p/v.

In the methods of hidrotérmica extraction, expansion for explosion and hidrolisis acidic the design was used factorial; those who allowed to determine the effects of temperature, time and relation in the method hidrotérmico; pressure, percentage of moisture and weight in expansion method for explosion in function to the FDN concentration. While in the acidic hidrolisis there evaluated the effects of time and concentration of acid as regards the sugar concentration differentials (AR) in both extraction methods.

Words Fix: Pretreatment hidrólisis, hidrotérmico, expansion for explosion, sugar differential, fibre.

I. INTRODUCCIÓN

Las hojas del *Agave americana* se consideran como un sub producto agroindustrial cuyo componente mayoritario es la fibra insoluble; la que tiene un potencial de utilización como uso de productos en la obtención de azúcares fermentables para procesos biotecnológicos.

En la actualidad se han realizado diversas investigaciones para obtener azúcares reductores de materiales lignocelulósicos por diversos tratamientos; sin embargo no existe una solución definitiva por lo que existe la necesidad de desarrollar otras tecnologías de aprovechamiento. Además en los últimos 15 años los científicos tomaron interés en la investigación de la biomasa lignocelulósica en particular en los residuos de agricultura, silvicultura y residuos agroindustriales por el bajo costo de estas materias primas; siendo la región de Apurímac con una considerable producción del *Agave americana* las que pueden ser aprovechadas de forma beneficiosa para la producción de azúcares monoméricos.

La composición química de la biomasa lignocelulósica, básicamente está constituida principalmente por los polímeros de celulosa, hemicelulosa, lignina y extractivos. La celulosa es un polímero lineal formado por unidades de glucosa por enlaces β (1,4) las que presentan fuertes uniones intermoleculares formando propiedades cristalinas, la que hace que sea insoluble en el agua; en cambio la hemicelulosa está constituido por pentosas, hexosas y presentan una estructura amorfa la que hace que sea mucho más soluble a los solventes químicos durante la hidrólisis. Para la producción de azúcares reductores (AR) a partir de la fibra insoluble del *Agave* es necesario cuantificar el contenido de fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y lignina detergente ácida (LDA) después de

cada proceso de extracción las que serán útiles para poder definir la cantidad de polímeros existentes.

El problema más importante para la obtención de azúcares reductores es la impermeabilidad de la lignina polímero de difícil degradación, siendo necesario utilizar pretratamientos que modifiquen la estructura para facilitar el proceso de hidrólisis de celulosa y hemicelulosa, en efecto la conversión eficaz de la biomasa lignocelulósica recalcitrante a azúcares fermentables requiere tres pasos; reducción de tamaño, pretratamiento y hidrólisis.

Por consiguiente, el presente trabajo de investigación se enmarca dentro de los siguientes objetivos.

a) Objetivo general

Extraer fibras de las hojas del *Agave americana* por métodos de pretratamiento hidrotérmico y expansión por explosión para la obtención de azúcares reductores mediante hidrólisis ácida.

b) Objetivos específicos

- Evaluar los parámetros de extracción en el método de pretratamiento hidrotérmico a las fibras de las hojas del *Agave americana* en función de fibra detergente neutro (FDN) y seleccionar el mejor tratamiento.
- Evaluar los parámetros de extracción en el método del pretratamiento de expansión por explosión a las fibras de las hojas del *Agave americana* en función de fibra detergente neutro (FDN) y seleccionar el mejor tratamiento.
- Efectuar una hidrólisis ácida a las fibras de las hojas del *Agave americana* de cada pretratamiento seleccionado para la obtención de azúcares reductores.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Aspectos generales del maguey (*Agave americana*)

El *Agave americana* linné pertenece a la familia *agavaceae* el que está conformado por un grupo de más de 650 plantas tropicales y subtropicales; dando lugar a su clasificación taxonómica como se muestra en la tabla 01 (Ricks *et al.*, 1999); según estudios recientes afirman que esta planta *agavaceae* es de origen mexicano, las que fueron extendidas posteriormente en el resto de los continentes como Asia, Norteamérica, Sudamérica central y tropical (Mylsamy y Rajendran 2011; Jurado y Sarzosa, 2009).

Como la mayoría de las fibras naturales, el *Agave* es formado por bultos fibrosos principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina también con un contenido bajo de ceras y cenizas (Bessadok *et al.*, 2008), las mismas que dan refuerzo y rigidez a las hojas.

Tabla 01. Clasificación taxonómica del maguey (*Agave americana*).

Reino	Vegetal
División	<i>Spermatophyta.</i>
Clase	<i>Angiospermae</i>
Subclase	<i>Monocotyledonea</i>
Orden	<i>Liliflorarae</i>
Familia	<i>Agavaceae</i>
Genero	<i>Agave</i>
Especie	<i>Agave americana</i>
Reino	<i>Vegetal</i>

(Ochoa, 2009).

Las hojas del maguey son gruesas y succulentas, poseen células especializadas para el almacenamiento de agua, el número de hojas por roseta varían de 20 a 200, dependiendo de la especie; estas poseen una cutícula dura, las que permiten una mejor adaptación para prevenir la pérdida de agua en zonas desérticas (Guillot, *et al.*, 2008).

Las mismas que están cubiertas por una fina película de cera constituida fundamentalmente por alcoholes, ésteres, ácidos grasos e hidrocarburos además de gomas, pectinas, almidones, clorofila que evitan la pérdida del agua (Vilcanqui, 2009; Thamae *et al.*, 2008). Por otro lado la savia constituida en las hojas, está compuesta por cristales oxalato de calcio, goma y saponinas estas saponinas constituyen de 1 a 2% en base seca (Ricks *et al.*, 1999; Escamilla, 2011).



Figura 01. *Agave americana* (Adaptación propia)

La mayoría de los nutrientes son almacenados en las hojas, los cuales eventualmente se moverán hacia la inflorescencia. Cuando la planta florece, las hojas empiezan a declinar, mientras se forman las flores y frutos las hojas se van secando y endureciendo. La mayoría de las plantas del género *Agave* son monocárpicas, lo cual quiere decir que después de su único evento reproductivo mueren (Carrera, 2005). El

crecimiento de las plantas *agavaceas* alcanzan hasta una altura de 2 a 12 m en un periodo de 5 a 15 años (Sarah *et al.*, 2011).

2.2 Componentes químicos de las fibras de *Agave*

Como la mayoría de las fibras vegetales, las fibras de *Agave* están compuestas principalmente por celulosa, lignina, hemicelulosas y cenizas, cuya descripción se detalla en la figura 02 (Gumeta, 2009).

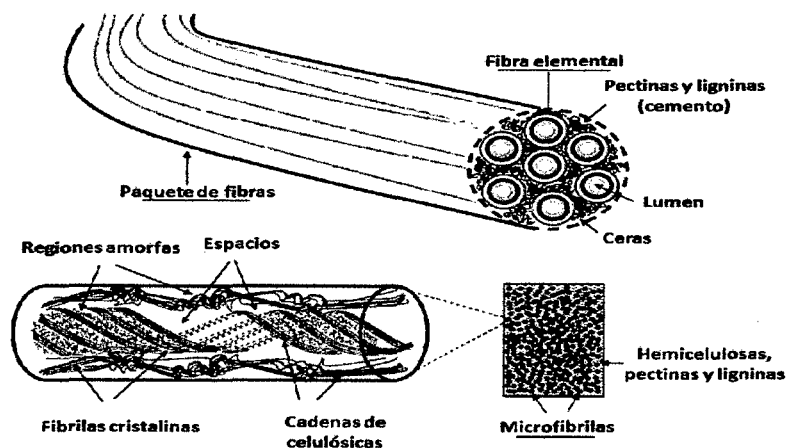


Figura 02. Estructura de una fibra lignocelulósica (Bessadok *et al.*, 2009).

2.3 Componentes de la biomasa lignocelulósica

La composición de la biomasa lignocelulósica está constituida por celulosa, hemicelulosa, denominadas macromoléculas las que están compuestas por diferentes azúcares las que se muestran en la tabla 02 y la lignina conformada a partir de precursores aromáticos fenil propanoides; con pequeñas cantidades de extractivos (Saxena *et al.*, 2009; Hendriks y Zeeman, 2009; Sánchez, 2009) es un término utilizado para todo aquel material orgánico que proviene de las plantas incluyendo las algas y todo tipo de vegetación e incluso residuos orgánicos (Crespo, 2009);

generalmente las condiciones climáticas y edad no solo influyen en la estructura de la fibra, sino también en su composición química de estas fibras naturales (Bledzki y Gassan, 1999).

Tabla 02. Principales compuestos de la biomasa lignocelulósica

Componente	Formula	Estado
Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	Líquido
Xilosa	$C_5H_{10}O_5$	Líquido
Celulosa	$C_6H_{10}O_5$	Sólido
Xilán (Hemicelulosa)	$C_5H_8O_4$	Sólido
Lignina	$C_{7,3}H_{13,9}O_{1,3}$	Sólido

Fuente: (Ojeda, 2011).

En efecto la biomasa lignocelulósica representa la fracción principal de mayor parte en planta, las que se clasifican en residuos agrícolas (bagazo de caña de azúcar, bagazo de maíz, paja de trigo, paja de arroz, paja de cebada), maderas duras (alamo, chopo), maderas blandas (pino), residuos celulósicos (papel de periódico, residuos de papel de oficina), biomasa herbácea (alfalfa, alpiste), las que están constituidas por celulosa 20 – 50%, hemicelulosa 20 - 35% las que varían según el tipo de biomasa como se observa en tabla 03 (Wyman, 1994; Tomás, 2010).

Tabla 03. Contenido lignocelulósico en distintas materias primas.

Material lignocelulósico	Celulosa %	Hemicelulosa %	Lignina%
Madera dura	40-55	24-40	18-25
Madera suave	45-50	25-35	25-35
Cascara de nuez	25-30	25-30	30-40
Olote de maíz	45	35	15
Desechos de pastos	25-40	35-40	18-30
Papel	85-99	0	0-15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-20	80-85	0
Algodón	80-95	0	0
Papel periódico	40-55	25-40	18-30
<i>Agave americana</i>	80	5	15

Fuente: (Ye Sun y Cheng, 2002; Hamissa *et al.*, 2010).

2.3.1 Celulosa

Es un polímero estructural de todo reino vegetal; por lo que se considera el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza y constituye una fuente de glucosa inagotable que se renueva de forma continua mediante la fotosíntesis (Badui, 2006).

La celulosa ($C_6H_{10}O_5$)_n es un polímero lineal que consiste en β (1-4) glucopiranosas unidas por enlaces D-glucosa y representan en un 40 - 60% de peso en la biomasa (Schacht *et al.*, 2008; Ahmad y Shaza, 2011); siendo así el componente principal de las paredes celulares vegetales (Dieter, 1985).

En una planta la celulosa se encuentra en una estructura organizada (celulosa cristalina) y otra estructura no bien organizada (celulosa amorfa). Las capas de celulosa son "agrupados" y juntos forman las llamadas fibrillas de celulosa las que están cubiertas por hemicelulosa y lignina. Estas fibrillas de celulosa son en su

mayoría independientes y débilmente unidos por puentes de hidrógeno (Hendriks y Zeeman, 2009; Crespo, 2009).

Muchas propiedades de la celulosa dependen de su grado de polimerización es decir el número de unidades de glucosa que arregla una molécula de polímero, el grado de polimerización de la celulosa puede extenderse a un valor de 17000, aunque comúnmente varía de 800 – 10000 unidades; la celulosa es un material relativamente hidrofóbico al agua en un 8 - 14% absorbente en condiciones atmosféricas normales (20 °C, humedad relativa del 60%). Sin embargo, es insoluble en el agua y también en soluciones ácidas diluidas a temperaturas bajas (Harmsen *et al.*, 2010).

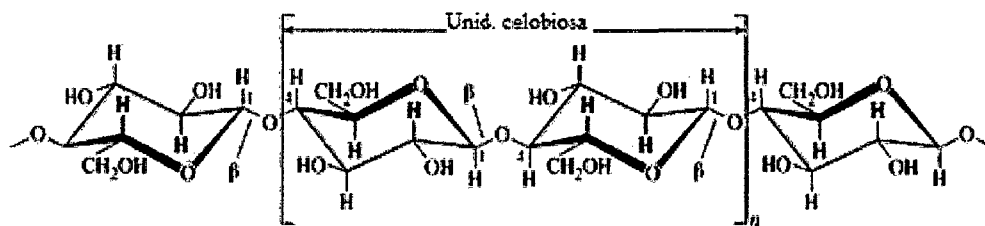


Figura 03. Estructura de la celulosa (Ahmad y Shaza, 2011).

2.3.2 Hemicelulosa

Se localiza principalmente en la pared celular y son muy distintos a la celulosa, presenta una estructura amorfa aun cuando algunos tipos desarrollan una forma fibrilar (Badui, 2006).

La hemicelulosa es una estructura compleja de hidratos de carbono, que consiste en diferentes tipos de polímeros denominados heteropolisacáridos, formados por pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (manosa, glucosa y galactosa), y los ácidos urónicos (galacturónico y glucurónico). El componente dominante de la hemicelulosa en madera dura, plantas agrícolas (hierbas, paja) es el xilano, mientras

que para la madera blanda es el glucomanano (Hendriks y Zeeman, 2009; Cuervo *et al.*, 2009); en efecto la hemicelulosa contiene 15% de hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) y 85% de pentosas (D-xilosa 75% y L-arabinosa 10%) (Saval, 2012);

Aunque su estructura amorfa y muy bifurcadas de la hemicelulosa lo hace más fácilmente hidrolizable debido a su grado de polimerización de no mayor a 200 unidades y un mínimo de 150 monómeros aproximadamente, los organismos natales no hacen eficazmente fermentable debido a los azúcares provenientes de las pentosas (Charles, 2005; Harmsen *et al.*, 2010).

Generalmente la hemicelulosa está comprendiendo sobre 1/3 de la biomasa de la planta total (Charles, 2005); su componente más abundante es la que está integrada por la unión de enlaces β (1-4) unidas por azúcares D-xilopiranosas; a esta estructura lineal básica ocasionalmente se le alcanzan grupos de L-arabinofuranosas mediante los carbonos 2 o 3 de la xilosa (Badui, 2006).

La solubilización de compuestos de la hemicelulosa en el agua a condiciones neutras está en orden descendente: manosa, xilosa, glucosa, arabinosa y galactosa. Sin embargo a partir de 150 °C la hemicelulosa se solubiliza; la solubilización de los componentes lignocelulósicos no sólo depende de la temperatura, sino también de otros aspectos como el contenido de humedad y pH (Hendriks y Zeeman, 2009).

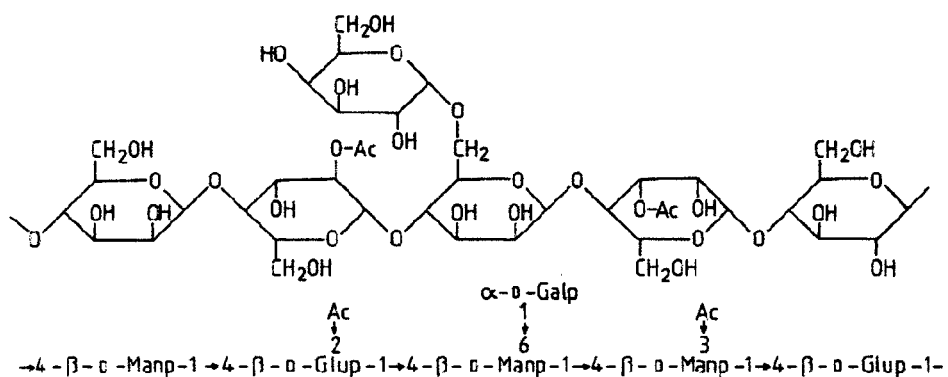


Figura 04. Estructura básica de la hemicelulosa (Araque, 2008).

2.3.3 Lignina

La lignina es el compuesto no carbohidrático que da rigidez a la planta; está ligada tanto a la hemicelulosa y celulosa, formando así un sello físico que es una barrera impenetrable en la pared celular de las plantas. Es un heteropolímero amorfo, insoluble en agua (hidrofóbico) y ópticamente inactivo que se forma a partir de unidades fenilpropano unidas entre sí por vínculos no hidrolizables. Este polímero es sintetizado por la generación de radicales libres, que son liberados en la deshidrogenación peroxidasa mediada por tres alcoholes fenil propiónico: alcohol coniferílico (unidades guayacilo), alcohol cumarílico (unidades p-hidroxifenilo), y alcohol sinapílico (unidades siringilo) (Sánchez, 2009).

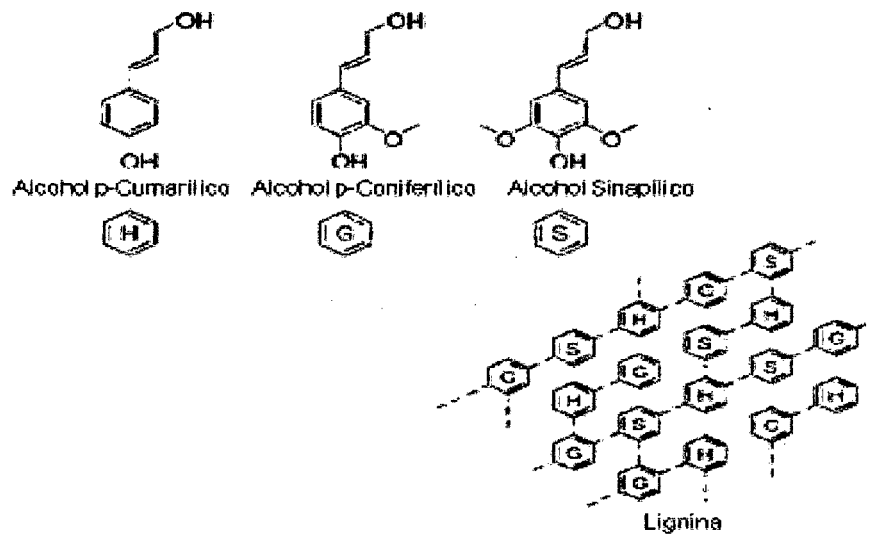


Figura 05. Monómeros de lignina (Cuervo *et al.*, 2009).

La lignina se puede dividir en tres tipos en función a sus alcoholes; lignina de maderas blandas (gimnospermas (G)), lignina de maderas duras (angiospermas leñosas (G y S)) y la de plantas herbáceas (angiospermas no leñosas (H)) (Quevedo,

2011). En general las plantas herbáceas tienen los contenidos más bajos de lignina, mientras que maderas blandas tiene el contenido más alto (Kumar *et al.*, 2009); La lignina polimérica impide el acceso a enzimas y productos químicos para la reducción de la degradabilidad a azúcares monoméricas de hemicelulosa y celulosa (Abramson *et al.*, 2010; Sarah *et al.*, 2011) no obstante son solubles a solventes alcalinos y fácilmente condensado con fenol. (Maya y Sabu, 2008).

2.3.4 Extractivos

Se denominan extractivos a los compuestos orgánicos de bajo peso molecular que están presentes en los materiales lignocelulósicos y que pueden extraerse con disolventes orgánicos o mezclas de los mismos, tales como etanol, benceno, cloroformo y otros. Las resinas son extractivos característicos de las maderas y están compuestas por terpenos y otros compuestos aromáticos, también denominados extractivos las ceras, ácidos grasos, y alcoholes, taninos y flavonoides, las que representan entre el 4 a 10% del peso total del material (Abril, 2008). Por otro lado la ceniza presente en la biomasa contiene principalmente Ca, K, Mg (Tomás, 2010).

2.4 Pretratamiento para el proceso de extracción

El pretratamiento para el proceso de extracción ha sido visto como uno de los pasos más caros del procesamiento de la biomasa lignocelulósica, estimando que el pretratamiento representa aproximadamente el 33% del costo total del proceso (Perego y Bianchi, 2010; Almenares *et al.*, 2011).

El objetivo del pretratamiento es modificar la estructura macroscópica y microscópica del material lignocelulósico, es decir quitar la lignina y hemicelulosa

del revestimiento de la celulosa; también reducir su cristalinidad de la celulosa y aumentar la porosidad, para dar accesibilidad a la hidrólisis (Almenares *et al.*, 2011; Fitz Patrick *et al.*, 2010); durante el pretratamiento se debe encontrar las siguientes exigencias. (1) Mejora la formación de los azúcares o la capacidad de formar posteriormente los azúcares por hidrólisis enzimática. (2) Evita la degradación o la pérdida del hidrato de carbono. (3) Evita la formación de subproductos inhibitorios a la hidrólisis subsecuente y proceso de fermentación. (4) Tratamiento rentable (Somesh, 2008).

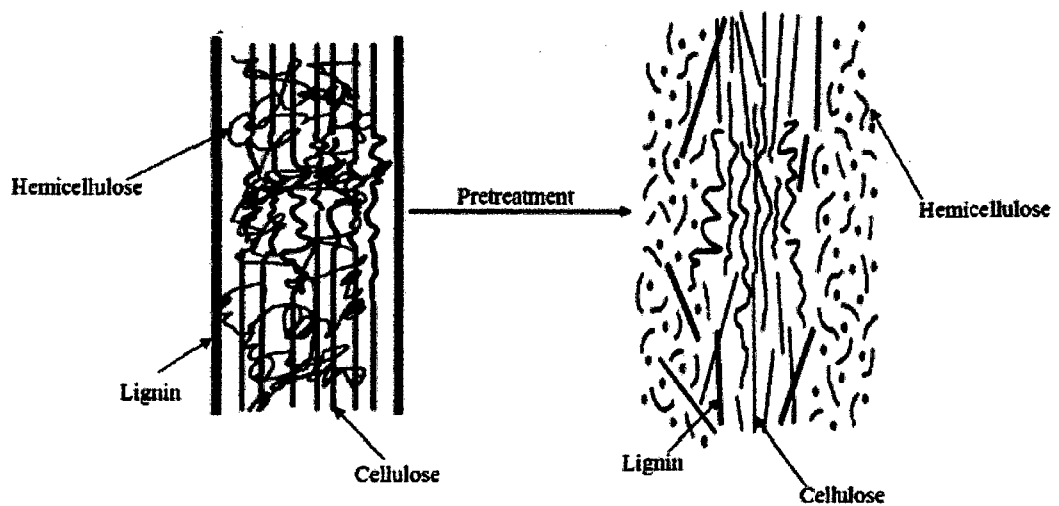


Figura 06. Pretratamiento en la conversión de biomasa (Kumar *et al.*, 2009).

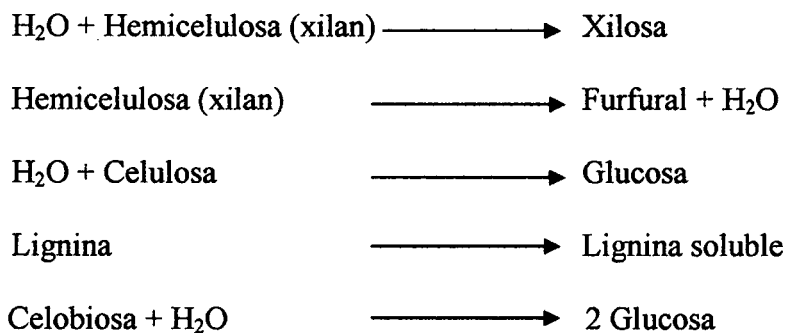
Se denomina pretratamiento al conjunto de acciones para mejorar el rendimiento en la obtención de azúcares fermentables desde la biomasa inicial (Guarnizo *et al.*, 2009), muchos métodos han sido usados para pre tratar materiales lignocelulósicos; las que se dividen en diferentes categorías: físico (molienda), fisicoquímicas (pretratamiento de autohidrólisis de vapor), químico (alcalino, ácido, ácido diluido, solventes orgánicos) y biológicos (Soccol *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2009), en la tabla 04 se observa algunos pretratamientos.

Tabla 04. Solubilización de los componentes lignocelulósicos después de los pretratamientos.

Proceso	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Explosión de vapor	despolimerización	80-100%	poca o nula
Hidrolisis ácida	despolimerización	solubilización	poca o nula
Solventes orgánicos	-----	solubilización	solubilización
Termólisis	poca	80-100%	
Hidrolisis alcalina	relajamiento	>50%	Solubilización

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

En los pretratamientos se simulan principalmente las siguientes reacciones (Ojeda, 2011).



2.4.1 Pretratamientos de extracción física

En el pretratamiento de extracción física no se usan reactivos químicos, estos pretratamientos pueden ser tales como pulverizado mecánico y radiación de alta energía (Zheng *et al.*, 2009).

Por otro lado la energía que se requiere en el tratamiento previo es relativamente alta, dependiendo del tamaño final y las características de la biomasa. (Hendriks y Zeeman, 2009).

2.4.1.1 Pretratamiento mecánico

El pretratamiento mecánico también denominado pulverización mecánica es la reducción de tamaño de partícula y cristalinidad del material lignocelulósico con el fin de aumentar el área superficial específica y reducir el grado de polimerización (Zheng *et al.*, 2009). Esto puede ser producido por una combinación de picar, moler o triturar en función al tamaño de las partículas del material final (10-30 mm y 0.2-2 mm) (Alvira *et al.*, 2009).

Sin embargo, el mecanismo de pulverización es improbable que la molienda sea todavía económicamente factible por el gasto de energía elevado; además la pulverización mecánica es mucho menos eficaz que el pretratamiento químico desde ello no causa el retiro de la lignina. Por lo tanto, está es usada rara vez como un método de pretratamiento (Zheng *et al.*, 2009 y Agbor *et al.*, 2011).

2.4.1.2 Radiación de alta energía

La digestibilidad de la biomasa celulósica ha sido realizada por el uso de métodos de radiación como los rayos gama que hienden el β -1,4 glucosídico, así dando un área superficial más grande y baja cristalinidad. Este método será indudablemente muy caro (Agbor *et al.*, 2011).

2.4.2 Pretratamiento de extracción fisicoquímico

Esta categoría incluye en su gran mayoría tecnologías de pretratamientos como explosión de vapor, agua caliente líquida, explosión de fibra de amoníaco (AFEX) y dióxido de carbono (CO₂) (Agbor *et al.*, 2011).

2.4.2.1 Explosión de vapor

El pretratamiento de explosión de vapor es principalmente una reacción de autohidrólisis química que quita hasta cierto punto la hemicelulosa y lignina. Las variables importantes en el pretratamiento de explosión de vapor; es el tiempo, temperatura, tamaño de partícula y el contenido de humedad. Es importante que las partículas no contengan excesiva humedad; ya que si los poros contienen agua, la penetración de vapor no ocurrirá rápida y la transferencia se calentará por conducción, en la que retrasara la iniciación de autohidrólisis (Duff y Murrayh, 1996; Ye sun y Cheng, 2002). Por lo que es uno de los pretratamientos más efectivos para las maderas duras y desechos agrícolas, pero menos eficiente para maderas suaves (Cuervo *et al.*, 2009).

La explosión de vapor no catalizada también es llamada autohidrólisis, en la cual sólo el vapor de agua es usada, es uno de los métodos de pretratamiento más comunes, durante el pretratamiento de la hemicelulosa a menudo es hidrolizada por ácidos orgánicos como el ácido acético y otros ácidos las que se forman del acetil u otros grupos funcionales, liberados de la biomasa. Además el agua mismo, también posee cierta propiedad ácida a temperaturas altas (Zheng *et al.*, 2009).

Las ventajas principales del pretratamiento con explosión a vapor son: (1) produce material lignocelulósico que es completamente susceptible a la hidrólisis enzimática. (2) menos exigencia en energía que el proceso mecánico. (3) no hace que tenga reciclaje o gastos ambientales asociados a pretratamientos químicos predominantes. Así mismo su limitación es la destrucción de una parte de la fracción xilano, interrupción incompleta de lignina, generación posible de inhibidores por las temperaturas altas (Duff y Murrayh, 1996; Agbor *et al.*, 2011). La explosión de

vapor se considera la opción más rentable para madera dura y residuos de agricultura, pero menos eficaz para madera blanda; la explosión de vapor se inicia a una temperatura de 433 - 533 °K o 160 – 260 °C con una presión 0.69 - 4.83 MPa durante varios segundos a varios minutos (Balat, 2011; Ye Sun y Cheng, 2002).

2.4.2.2 Agua caliente líquida (LHW)

El agua caliente líquida tiene la ventaja principal de solubilizar la hemicelulosa y lignina; presenta concentraciones inferiores en la degradación de furfural y la precipitación de compuestos de lignina son reducidas además de ello otra de las ventajas es el bajo costo del solvente (Hendriks y Zeeman, 2009). Una de las desventajas es que durante el procesamiento de la biomasa en volúmenes grandes el gasto de energía es mayor (Agbor *et al.*, 2011).

El LHW reduce la neutralización ya que no es condicionado a productos químicos. Durante el pretratamiento LHW, la hendidura de O-acetil y sustituciones de ácido urónico de la hemicelulosa produce el ácido acético y otros ácidos orgánicos que ayudan catalizar la hidrólisis de polisacáridos; tal como la hemicelulosa primero en oligosacáridos y luego en azúcares monoméricos (Zheng *et al.*, 2009). En consecuencia el agua caliente hiende encadenamientos de hemiacetal dando lugar a la liberación de ácidos durante la hidrólisis de la biomasa que facilita la ruptura de encadenamientos de éter. La aplicación de este método fue en fibras de maíz a escala de laboratorio controlando el pH en un reactor de 163 l/min. (Agbor *et al.*, 2011).

2.4.2.3 Explosión de fibra de amoníaco (AFEX)

En este pretratamiento los materiales lignocelulósicos son expuestos a amonio líquido a temperaturas entre 60 – 100 °C y a una presión alta durante un periodo de tiempo variable, en la que la presión soltada causa una extensión rápida del gas de amonio causando hinchazón e interrupción física en las fibras de la biomasa y parcial descristalinización de la celulosa. El pretratamiento de AFEX puede considerablemente mejorar los precios de sacarificación en las cosechas herbáceas tales como alfalfa, paja de trigo, paja de cebada, maíz stover, paja de arroz, residuos orgánicos (Ye Sun y Cheng, 2002; Alvira, 2009).

2.4.2.4 Dióxido de carbono (CO₂)

El método está basado en la utilización de CO₂ como un fluido supercrítico, que se refiere a un fluido que está en un estado gaseoso la que es comprimida en temperaturas por encima de su punto crítico a una densidad parecida al líquido. Las condiciones de pretratamiento supercríticas pueden con eficacia quitar la lignina. Las moléculas de CO₂ son comparables en el tamaño al agua y el amoníaco; ellos pueden penetrar del mismo modo a los poros del material lignocelulósico. Este mecanismo es facilitado por la presión alta después de la liberación explosiva de CO₂ (Alvira *et al.*, 2009), formando el ácido carbonico que ayuda en la hidrólisis de hemicelulosa las presiones utilizadas en este pretratamiento oscilan entre 1000 – 4000 psi y por lo general varios minutos y a temperaturas altas hasta 200 °C (Agbor, *et al.*, 2011).

2.4.3 Pretratamiento de extracción química

El pretratamiento de extracción química fue al principio desarrollado extensivamente en la industria papelera para la deslignificación de materiales celulósicos para producir altos productos de papel de calidad. Por lo que el pretratamiento químico ha sido estudiado hasta ahora; teniendo el objetivo primario de mejorar la biodegradabilidad de la celulosa quitando la lignina, hemicelulosa y disminuyendo el grado de polimerización y cristalinidad del componente de celulosa (Zheng *et al.*, 2009).

2.4.3.1 Pretratamiento con ácido

Entre todos los métodos de pretratamiento el más estudiado extensamente ha sido el ácido diluido por ser eficaz y barato. Por lo tanto mejora la conversión de celulosa comparado con otro método de pretratamiento. El pretratamiento con ácido fue sacado de la hidrólisis ácida concentrada así como H_2SO_4 , HCl que había sido una tecnología principal para hidrolizar la biomasa lignocelulósica en la producción de azúcares fermentables (Zheng *et al.*, 2009).

Los pretratamientos de ácidos diluidos para los materiales lignocelulosicos pueden funcionar en dos condiciones a una temperatura alta de 160 - 200 °C con bajas cargas de sólido de 5 - 10% y temperatura baja de 120 - 160 °C con una carga de sólidos de 10 - 40% (Kumar *et al.*, 2009; Niklitschek, 2010).

El efecto principal de los ácidos diluidos es la hidrólisis de hemicelulosa en la biomasa; la lignina y la celulosa no se hidrolizan en las condiciones de pretratamiento (Dushyant, 2012). Cabe mencionar que el ácido sulfúrico diluido

tiene algunas limitaciones importantes, como la corrosión y materiales costosos de construcción (Mosier *et al.*, 2005).

Su aplicación del ácido sulfúrico diluido en materiales lignocelulósicos a sido usado comercialmente para producir furfural la que es purificado por destilación; este pretratamiento se ha aplicado a los residuos de maíz, cosechas herbáceas (Agbor *et al.*, 2011).

2.4.3.2 Pretratamiento alcalino

El proceso alcalino está basado en la utilización de bases diluidas para la eliminación de la lignina este pretratamiento es más eficaz en biomásas que contengan lignina baja así como residuos agrícolas (paja de trigo) pero menos eficaz en biomásas que contengan mayor cantidad de lignina (Agbor *et al.*, 2011) el principio del proceso alcalino en los materiales lignocelulosicos es que causan hinchazón, aumento del área superficial interna y disminución de la cristalinidad de la celulosa (Ye Sun y Cheng, 2002). El pretratamiento alcalino puede ser llevado a cabo en condiciones ambientales, pero el tiempo de pretratamiento se mide en términos de horas o días en vez de minutos o segundos a diferencia de pretratamiento catalizados por ácido, la limitación se debe a que algunos de los alcalinos se convierte en sales irrecuperables o incorporados como sales en la biomasa de las reacciones de pre tratamiento. En la cual se menciona que la Cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ (hidróxido de calcio)) tiene las ventajas adicionales por el bajo costo frente a los otros tratamientos alcalinos como hidróxido de sodio, potasio, calcio e hidróxido de amonio (Mosier *et al.*, 2005).

2.4.4 Pretratamiento de extracción biológico

En el pretratamiento de extracción biológica emplean microorganismos principalmente marrón, blanco y hongos de putrefacción suave que degradan lignina y hemicelulosa; las putrefacciones marrones principalmente atacan a la celulosa, mientras las putrefacciones blancas y suaves atacan tanto la celulosa como lignina. Las ventajas de los pretatamientos biológicos es la exigencia baja de energía reduciendo así en el precio de la hidrólisis. (Ye Sun y Cheng, 2002).

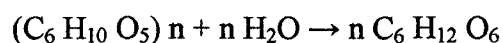
El pretratamiento biológico es demasiado lento para objetivos industriales por el tiempo de residencia de 10 - 14 días, la exigencia cuidadosa y condiciones para el crecimiento y cantidad de espacio amplio son las desventajas que hacen que este método de pretratamiento sea menos atractivo por una escala industrial (Agbor *et al.*, 2011), durante el pretratamiento de paja de trigo se uso la putrefacción con hongos blancos en la que se encontrado que el 35% de la paja de trigo fue convertido a azúcar reductor después del pretratamiento de cinco semanas con *Pleurotus ostreatus* comparado con la conversión de sólo el 12% de la paja no tratada (Talebnia *et al.*, 2009).

2.5 Hidrólisis

La hidrólisis provoca la ruptura en los polímeros de celulosa y hemicelulosa, generando rompimiento de enlaces entre moléculas de glucosa de tal manera que se obtiene los monómeros respectivos de las pentosas y hexosas, para un periodo de tiempo, temperatura específica (Balat, 2011; Cuervo *et al.*, 2009; Parsons y Ramith, 2004), el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido solubiliza a la hemicelulosa con

eficacia a azúcares monosacáridos (arabinosa, galactosa, glucosa, manosa y xilosa) (Zheng *et al.*, 2009).

También se le denomina hidrólisis a la reacción realizada generalmente por enzimas y productos químicos las que tienen como objetivo de reducir la celulosa a compuestos sacáridos principalmente a glucosa (Ren *et al.*, 2009; Almenares *et al.*, 2011), como se puede observar en la siguiente ecuación de la celulosa la que es descompuesta a sus componentes básicos de glucosa (Ahmad y Shaza, 2011).



La hidrólisis ácida catalizada a la celulosa es una reacción en la cual cationes de hidrogeno (H^+) y aniones de hidróxido (OH^-) son divididas por moléculas de agua las que reaccionan con la celulosa polimérica generando varios productos importantes como la glucosa, xilosa, arabinosa y celobiosa las que pueden ser formadas fácilmente por la hidrólisis catalizada por el ácido de celulosa tanto por ácidos orgánicos como ácido carborxilico y ácidos inorgánicos como ácido sulfúrico (H_2SO_4) y ácido clorhídrico (HCl) (Hui Zhou *et at.*, 2011).

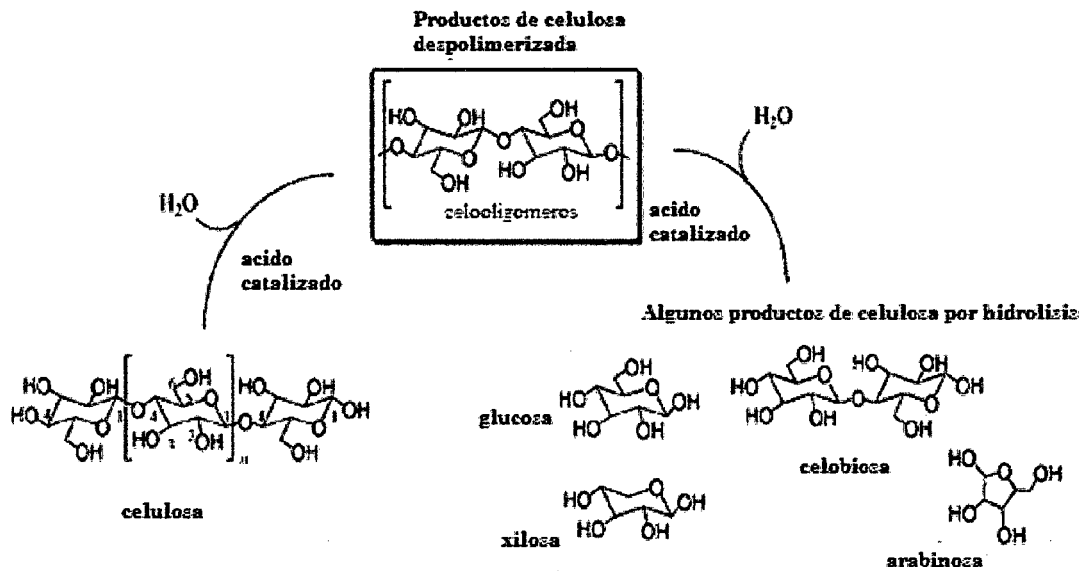


Figura 07. Productos catalizados por la hidrólisis ácida (Hui Zhou *et al.*, 2011).

La diferencia del grado de polimerización y peso molecular influye durante la hidrólisis, ya sea mediante el uso de enzimas o productos químicos (Tomás, 2010), cuando el ácido sulfúrico es calentado a temperaturas altas, las cadenas cristalinas de celulosa se estropean a grupos más cortos formando unidades de glucosa (García y Martín, 2006).

2.5.1 Tipos de hidrólisis

La hidrólisis diluida y ácida es probablemente el método más común aplicado entre las sustancias químicas en los métodos de pretratamientos. Este método puede ser realizado a un tiempo corto y temperatura alta o tiempo largo y temperatura baja (Ahmad y Shaza, 2011).

2.5.1.1 Hidrólisis de ácido diluido

La hidrólisis ácida diluída en la biomasa lignocelulósica ocasiona ruptura en la celulosa y hemicelulosa para formar de polímeros a moléculas de azúcar individuales que pueden ser fermentados a etanol (Wyman, 1994). Las ventajas del ácido diluido son: inferior corrosión al equipo, menos degradación de xilosa y menos subproductos (huang *et al.*, 2008).

El ácido diluido generalmente implica el uso de 0,5% - 15% de ácido sulfúrico para hidrolizar el material celulósico. Además, las temperaturas que van de 90 – 600 °C y la presión hasta 800 psi (Farone y Cuzens, 1998), por otro lado las concentraciones de ácido sulfúrico para la hidrólisis de hemicelulosa es de 0.5 – 1.5% y temperaturas de 121 – 160 °C donde la los procesos recuperación de azúcar oscilan de 70 % a 90% (Girio *et al.*, 2010).

El ácido diluido requiere relativamente temperaturas altas, que provoquen mayor degradación de azúcares de hemicelulosa (Almenares *et al.*, 2011); estas pueden ser realizadas con varios tipos de ácidos como ácido sulfúrico, clorhídrico, fórmico, fosfórico y nítrico; al emplear temperaturas de 200 - 240 °C, a una concentración de ácido 1.5% estas hidrolizan la cristalinidad de la celulosa, pero la degradación de glucosa en HMF y otros productos no deseados son inevitables en estas condiciones de tal manera que el rendimiento en la producción de azúcar disminuye (Cardona *et al.*, 2009; Galbe y Zacchi, 2002).

El laboratorio de energía Energía Renovable Nacional (NREL) en colorado Estados Unidos; ha desarrollado un proceso de hidrólisis de ácido diluido en dos etapas a fin de maximizar la producción de azúcar de las fracciones de celulosa y hemicelulosa y minimice la formación de subproductos. La primera etapa consiste en

la hidrólisis de la hemicelulosa que es realizada en condiciones más suaves usando ácido sulfúrico de 0.7% a 190 °C y un tiempo de 3 minutos, la segunda etapa es la hidrólisis de la celulosa usando ácido sulfúrico al 2.5% a 210 °C y un tiempo de 3 minutos. La ventaja de los ácidos diluidos es el precio y la desventaja es la producción de glucosa por debajo de 60% (Perego y Bianchi, 2010).

2.5.1.2 Hidrolisis de ácido concentrado

El proceso de ácido concentrado permite una hidrólisis de celulosa y hemicelulosa (Girio *et al.*, 2010), generando rompimientos en las cadenas largas de polisacáridos a segmentos más pequeños disacáridos y monosacáridos (Gómez, 2008). Generalmente el proceso de ácido concentrado da mayor producción de azúcar hasta un 90% y formación de subproductos inferiores comparados con el ácido diluido estos procesos funcionan a una temperatura de 80 °C a una concentración ácida de 70 – 77% un tiempo de resistencia más largo de 1 – 8 horas (Perego y Bianchi, 2010).

El proceso de ácido concentrado ha sido un tanto exitoso, ya que producen rendimientos más altos de azúcares. Estos procesos suelen exigir el uso de 60 a 90% de ácido sulfúrico, aunque con éxito la producción de los rendimientos de azúcar está por encima del 90% (Farone y Cuzens, 1998).

El ácido concentrado ofrece la ventaja de no utilizar ninguna enzima para la sacarificación, sin embargo, este proceso tiene sus inconvenientes, como alto consumo de energía, corrosión del equipo y mayor tiempo de reacción así como la obligación para la recuperación después del tratamiento con el ácido que en gran parte, limita su aplicación (Talebnia *et al.*, 2009).

2.6 Subproductos de la hidrólisis de biomasa lignocelulósica

Durante los pretratamientos presentan la generación de subproductos, algunos de estos son tóxicos para los microorganismos, incluida las levaduras. Estos inhibidores disminuyen el rendimiento y la producción de etanol (Cortinez, 2010).

En la Figura 08, se presentan algunas de las reacciones ocurridas durante la hidrólisis de materiales lignocelulósicos.

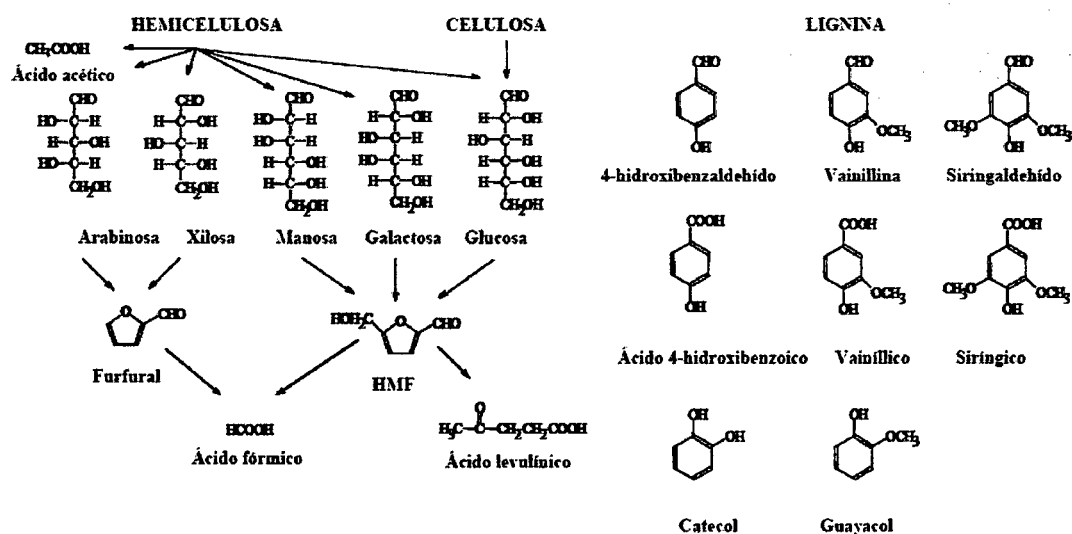


Figura 08. Reacciones producidas durante la hidrólisis de materiales lignocelulósicos (Tomás, 2010).

La celulosa, hemicelulosa y lignina pueden romper sus enlaces para formar glucosa, xilosa, manosa, galactosa y compuestos fenólicos de la lignina respectivamente. De los monómeros producidos, algunos de ellos se puede descomponer durante el proceso y formar compuestos como 5-hidroximetil furfural (HMF) desde las hexosas, y furfural desde las pentosas. HMF y furfural pueden también descomponerse en ácido levulínico y ácido fórmico (Cortinez, 2010).

2.6.1 Ácidos orgánicos

En el método de hidrólisis con ácido diluido se genera un gran número de ácidos alifáticos que son originados desde los extraíbles de madera, la degradación de la lignina y la degradación del azúcar desde la hemicelulosa de éstos, el ácido acético es el mayor constituyente y se produce por la degradación del grupo acetil en los polisacáridos; en cambio, el ácido levulínico y el ácido fórmico son productos de la degradación de azúcares como manosa, galactosa y fructosa (Cortinez, 2010).

2.6.2 Compuestos furanos

Furfural y 5-hidroximetil furfural (HMF) son productos de la descomposición de pentosas y hexosas, respectivamente (Cortinez, 2010), Por otro lado el furfural y HMF inhibe y afecta en la tasa de crecimiento de CO₂ (respiración), cabe señalar que el efecto toxico de HMF es menor que el furfural así mismo la conversión de furfural es mucho más rápido que HMF (Harmsen *et al.*, 2010), debido a que en el medio ácido la degradación de azúcares manomericas sigue el siguiente orden xilosa> arabinosa> manosa> galactosa> glucosa (Janga *et al.*, 2012).

Estudios cinéticos han mostrado que la producción de furfural y HMF incrementan fuertemente a temperaturas mayores a 160 °C y tiempos mayores a 4 horas. (Harmsen *et al.*, 2010), temperaturas moderadas menores a 160 °C proveen una adecuada hidrolisis de hemicelulosa con poca descomposición de azúcares; por otro lado, temperaturas superiores a 160 °C favorecen la hidrolisis de celulosa pero se generan productos tóxicos y también la descomposición de la lignina (Monsalve *et al.*, 2006).

2.7 Hidrato de carbono y azúcares reductores

2.7.1 Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono son compuestos formados por carbono, hidrogeno y oxígeno, en la que tiene una estructura de polihidroxialdehído o de polihidroxiacetona. Los hidratos de carbono son compuestos orgánicos abundantes en la naturaleza. La sacarosa (β -D-fructofuranosil- α -D-glucopiranososa) llamada comúnmente azúcar, está integrada por una glucosa cuyo carbono aldehído se une al cetónico de la fructosa, estableciendo un enlace glucosídico β (1,2) que impide que este disacárido sea reductor por carácter de grupos aldehído o cetona (Badui, 2006).

Por otro lado la biomasa lignocelulosa contiene típicamente 50 – 80% (base seca) de hidratos carbono en polímeros de 5 y 6 unidades de azúcar. Es más los hidratos de carbono pueden ser tratados por medios químicos o biológicos para procesos de biocombustibles (Zheng *et al.*, 2009).

2.7.2 Azúcares reductores (AR)

El azúcar reductor es un grupo aldehído o cetona cuya capacidad reductora esta libre (Alcázar, 2002). Los azúcares reductores totales (ART) no es más que una hidrólisis total practicada a las muestras a través de ácido y calor (Solís *et al.*, 2006). Generalmente en el reino vegetal se encuentran muchos azúcares de seis átomos de carbono, solo cinco se han aislado en estado libre, tres de los cuales son aldosas (glucosa, galactosa y manosa) y dos cetosas (fructosa y sorbosa) (Badui, 1990).

La fructosa y glucosa presentes en el *Agave* son dos azúcares reductores que pueden ser utilizados para obtener alcohol con un proceso de fermentación. Algunas especies de plantas, entre ellos el *Agave*, tiene como reserva de carbohidratos

polímeros de fructosa (fructosanos), en lugar de glucosa, tales como la inulina (Bautista *et al.*, 2001).

Los ensayos principales de azúcar reductor dependen de la reducción de oxidantes inorgánicos; como iones Cu^{2+} que acepta electrones de la donación de grupos aldehídos; su variedad de descubrimiento varia de menos $1\mu\text{g}$ por muestra a $> 2500\mu\text{g}$ por muestra (Percival Zhang *et al.*, 2006).

2.7.2.1 Método de análisis para la determinación de azúcar reductor

2.7.2.1.1 Método de ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS)

El método de DNS es el ensayo más común para medir azúcares reductores en la celulosa, esto es debido a su descubrimiento de azúcares relativamente altos, además de ello no realiza ninguna dilución de muestra requerida, tampoco ningún retiro de proteína. Sin embargo el inconveniente es la relación estequiometrica y el estándar de glucosa, en la tabla 05 se puede observar el macro y micro del estándar de glucosa (Percival Zhang *et al.*, 2006).

Tabla 05. Preparación macro y micro de la curva estándar de glucosa

Método	Muestra (ml)	Reactivo (ml)	Concentración (mg/L)
DNS (micro)	1-3	3	6,7-600
DNS (macro)	0,5	3	200-5000

Fuente: (Percival Zhang *et al.*, 2006).

En este método de ácido 3,5-dinitrosalicílico es reducido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, mientras que los grupos aldehídos son oxidados a grupos carboxilos. La reducción del ácido genera un color amarillo el cual es proporcional a la concentración del azúcar reductor presente y se evidencia por medio de la lectura de

absorbancia. Esta técnica demuestra la presencia del grupo carbonilo libre (C=O) de los azúcares reductores que implica la oxidación del grupo funcional aldehído de la glucosa (Miller, 1959), en efecto la coloración de la reacción de óxido reducción es estable hasta por 24 horas (Mejía *et al.*, 2007).

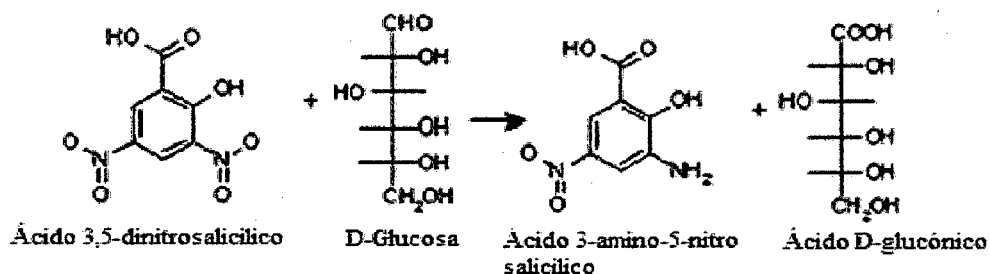


Figura 09. Reacción del ácido 3, 5 dinitrosalicílico (Rios, 2008).

2.8 Métodos detergentes para determinación de fibra

El método detergente ácido (FDA) propuesta por Van Soest (1963a y 1963b), en el que emplea un detergente catiónico, bromuro de cetil trimetil amonio (CATB), en H_2SO_4 1N. En 1967, Van Soest y Wine proponen el método neutro detergente, que consiste en la digestión con un detergente aniónico, lauril sulfato sódico, y ácido etilendiaminotetracético (EDTA) en medio neutro obteniéndose un residuo insoluble (FDN). Uno de los inconvenientes más importantes de los métodos detergentes es que no se determina la fracción soluble de la fibra; en la que se propone una modificación del método FDN por la cual cuantifican esta fracción, aunque estiman fibra insoluble (FI) y fibra soluble (FS) en dos muestras diferentes y con condiciones distintas de solubilización, corriéndose el riesgo de no cuantificar algunos componentes o cuantificarlos dos veces (Aparicio, 2008).

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Lugar de ejecución

La ejecución del trabajo experimental, se realizó específicamente en los laboratorios de Operaciones Unitarias, Biotecnología Agroindustrial y Química de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

La determinación de azúcares reductores se realizó en el laboratorio de Bioquímica y Parasitología de la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

3.2 Materia prima

Como materia prima se utilizó hojas de *Agave americana* en una cantidad de 9 kg por cada unidad experimental, procedentes del poblado de Villa Gloria alta de la provincia de Abancay departamento de Apurímac a una altitud de 2507 msnm.

3.3 Equipos, materiales, reactivos y utensilios

3.3.1 Equipos

- Autoclave.
- Balanza analítica digital marca Citizen modelo CT 602 capacidad 600gx 0.01g.
- Balanza analítica modelo AR 2140, capacidad 210g, con aproximación 0.0001.
- Baño maría.
- Cronometro.

- Espectrofotómetro marca Jenway modelo: 6405 UV/Vis.
- Estufa marca: Memmert, rango de temperatura 30 – 250 °C.
- Expansión por explosión marca Imo Hefan (Cañón Expansor).
- Licuadora industrial.
- Molino de disco.
- Mufla: barnstead Thermolynny modelo: FB1410M, rango 0- 1100°C.
- Potenciómetro.
- Secador de Lecho Fluidizado.
- Sellador a calor.
- Termómetro.

3.3.2 Materiales

- Bagueta (agitador).
- Bolsas de filtración de Ankom K – F 57.
- Botella de vidrio de 5 L.
- Botella resistente a altas temperaturas marca boeco.
- Bureta graduable de 50 y 100 ml.
- Capsulas de porcelana.
- Crisol.
- Cuchillo de acero inoxidable.
- Embudos 50 ml.
- Fiolas de 25, 50 y 250 ml.
- Frasco para esterilizar de 100 y 500 ml marca: boeco.
- Gradilla.

- Marcador resistente a solvente.
- Mortero.
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml.
- Placas petri.
- Probetas de 50 y 100 ml.
- Tabla de picar.
- Tubos de ensayo 15 ml.
- Vaso precipitado de 500 y 1000 ml.

3.3.3 Reactivos

- Acetona.
- Ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS).
- Ácido clorhídrico (HCl) 0.1 y 5N.
- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA).
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1.00N.
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2%.
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 4%.
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 72%.
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 8%
- Agua destilada.
- Bisulfito de sodio.
- Cetyl trimetilamonio bromuro (CTAB).
- Etileno glicol éter monoetílico.
- Fenol.

- Fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4).
- Glucosa anhidra.
- Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N y 2M.
- Sal de Rochelle (Na - K tartrato).
- Sulfato lauril sódico.
- Tetraborato de sodio decahidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$).

3.3.4 Utensilios

- Balde.
- Balón de gas.
- Bolsas de 5 kg.
- Cocina industrial.
- Colador de acero inoxidable.
- Envases de 1/2 litro con tapa rosca.
- Envases de 1/4 de litro para la muestra hidrolizada.
- Olla de acero inoxidable.

3.3.5 Indumentaria

- Gorra.
- Guantes resistentes a calor.
- Lentes para cubrir la vista de los ácidos.
- Mandil.
- Mascarilla de gases.

3.4 Población y Muestra

La población está representada por las fibras extraídas de las hojas del *Agave americana* envasadas en bolsas de polietileno de 200 a 230 gramos aproximadamente, que anteriormente fueron secadas en el secador de lecho fluidizado.

La técnica de muestreo para la extracción de fibras de las hojas del *Agave americana* se efectuó un muestreo no probabilístico debido a que no depende de la probabilidad si no de las características de la investigación.

3.5 Técnicas e Instrumentos de Análisis

3.5.1 Análisis químico a la fibra extraída de las hojas del *Agave americana*

3.5.1.1 Determinación de humedad por el método gravimétrico

El método está basado en la deshidratación de la muestra, por calentamiento en estufa a 100 ± 102 °C hasta un peso constante, Método 209.264 (NTP, 2001) ver anexo 01.

3.5.1.2 Cuantificación de fibra detergente neutra (FDN)

El método se fundamenta en la capacidad que tiene una solución detergente a pH neutro para extraer la fibra insoluble; determinando así los constituyentes de la pared celular origen vegetal celulosa, hemicelulosa, lignina algunas fracciones de minerales y proteínas, para la determinación de FDN se siguió la metodología descrita por (Ankom, 2008) como se detalla en el anexo 02.

3.5.1.3 Cuantificación de fibra detergente ácida (FDA)

La estimación del contenido de fibra detergente ácida, fue efectuada de acuerdo al procedimiento descrito por Van Soest la que se fundamenta en el uso de una solución detergente ácido preparada a base de bromuro de cetyl trimetil amonio (CTAB), disuelto en ácido sulfúrico a una concentración de 0.98 a 1.02 N, este detergente disuelve todo el contenido celular y además a la hemicelulosa; el remanente de la digestión se cuantifica como la cantidad de celulosa y lignina (Ankom, 2008; Sánchez, 2007), para el procedimiento de FDA se tomó la metodología descrita por (Ankom, 2008) las que se detallan en el anexo 03.

3.5.1.4 Lignina detergente ácida (LDA)

Para la cuantificación de la lignina, se utilizó la metodología descrita por (Vilcanqui, 2009) como se observa en el anexo 04, cuyo fundamento está basado en el uso de una solución de ácido sulfúrico de alta concentración al 72% la que disuelve la celulosa y por calcinación del desecho insoluble de la hidrólisis se determina fracción de la lignina (Ankom, 2008).

3.5.1.5 Análisis químico después del proceso de hidrólisis ácida

3.5.1.5.1 Azúcares reductores (AR)

Para la cuantificación de los azúcares reductores se utilizó el método descrito por (Miller 1959, Ghose 1987, Alarcón 2010, Dutta 2008), las que se detallan en el anexo 07; cuyo fundamento se basa en que el ácido 3,5 dinitrosalicílico en presencia de calor reduce al ácido 3 - amino - 5 nitrosalicílico por los azúcares reductores presentes, desarrollándose un color amarillo café (Miller, 1959).

Este método prueba la presencia del grupo carboxilo libre, llamado azúcar que reduce. Esto implica la oxidación del presente grupo funcional aldehído en glucosa y grupo funcional cetona en fructosa y simultáneamente el ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS) es reducido al ácido 3 - amino, 5 - nitrosalisílico en condiciones alcalinas (Aishwarya *et al.*, 2011).

3.6 Método de experimentación

El diagrama de flujo del proceso experimental de la extracción de fibra a partir de las hojas del *Agave americana* por diferentes métodos para la obtención de azúcares reductores se muestra en la figura 10, las que se detallan a continuación.

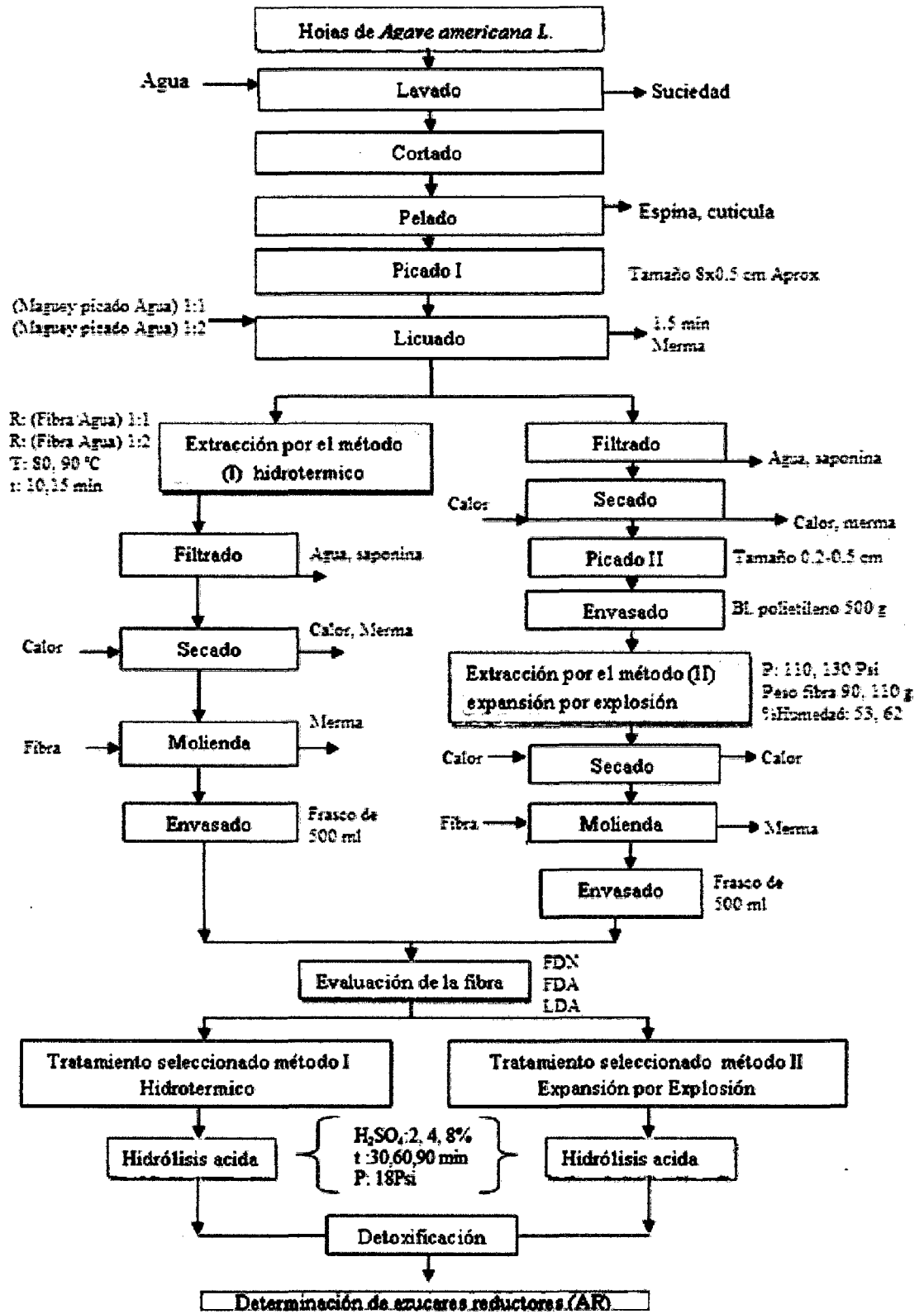


Figura 10. Diagrama de flujo para el desarrollo experimental de la extracción de fibra a partir de las hojas del *Agave americana* por diferentes métodos para la obtención de azúcares reductores.

3.6.1 Hojas de *Agave americana*

Las hojas de *Agave* se cosecharon de forma manual; desechando las que se encuentren en mal estado físico o tengan daños fisicoquímicos durante el transporte, las mismas que se llevaron al laboratorio de operaciones unitarias de Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

3.6.2 Lavado

Se realizó manualmente mediante chorreo directo, con la finalidad de retirar la suciedad de la capa externa cerosa que se adhieren durante el crecimiento de la planta y el transporte de las hojas.

3.6.3 Cortado

Las hojas se cortaron transversalmente; en longitudes de 6 a 8 cm de tamaño este proceso se realizó con un cuchillo de acero inoxidable sobre una tabla de picar para dar mayor facilidad en el pelado.

3.6.4 Pelado

Esta operación de pelado consiste en la eliminación de las espinas (borde) y la capa protectora al cual se le denomina cutícula (superficie externa) efectuándose de forma manual mediante el uso de un cuchillo de acero inoxidable y guantes quirúrgico para evitar el contacto directo y salpicaduras a la piel ya que estos ocasionan irritación en la piel. Es importante dejar libre la cutícula durante el pelado,

puesto que en esta superficie se encuentra la mayor cantidad de pigmentos de coloración verde (clorofila) la que imparte un color oscuro a la fibra.

3.6.5 Picado I

El proceso de picado se realizó de forma manual; en tamaños de 6 a 8 cm de largo y un ancho de 0.5 a 1 cm, esta operación se realizó con la finalidad de dar mayor facilidad durante el licuado.

3.6.6 Licuado

Esta etapa se realizó con una licuadora industrial eléctrica, la que está provista de dos cuchillas de acero inoxidable que al girar a altas revoluciones son capaces de cortar las fibras, esta operación se trabajó por Batch en proporciones de 1:1 y 1:2 fibra/agua (p/v) las que fueron licuadas durante un tiempo de 1 a 1.5 minutos.

3.6.7 Extracción de la fibra por métodos diferentes

Para la extracción de la fibra de *Agave* se utilizaron dos métodos denominados tratamiento hidrotermico (método I) y expansión por explosión (método II), con la finalidad de incrementar la concentración de FDN, y modificar los polisacáridos de la fibra.

3.6.7.1 Extracción por el método I

El método I (hidrotérmico) se hace referencia a la investigación realizada por (Vilcanqui, 2009) quien utilizó variables de operación, como temperatura, tiempo y relación materia prima/ agua; la que se fundamenta en el uso del agua como un

vehículo para remover los compuestos solubles no deseables para incrementar la concentración de la fibra.

La extracción hidrotérmica consistió en someter a un baño isotérmico a temperaturas de 80, 90 °C, las que fueron controladas con un termo sensor que fluctuó en un margen de error de ± 2 °C, la que fue introducida en el centro de la olla de acero inoxidable de 20 litros de capacidad, en la que se encontraban las fibras en las relaciones de 1:1, 1:2 (fibra de *Agave*/agua) de forma que se controlaron los tiempos de 10 y 15 minutos en cada unidad experimental correspondiente (ver tabla 06).

3.6.7.2 Extracción por método II

El método II (expansión por explosión), se realizó en un equipo denominado cañón expansor; diseñado para soportar altas presiones, la que se fundamenta en generar desnaturalizaciones en materias primas que están compuestas por almidón gracias a un desfase de descompresión en la materia prima. Tomando como referencia las caídas de altas presiones a bajas, se sometieron fibras de *Agave* con el propósito de generar daños físicos que ayuden a obtener mayor concentración de FDN; en las que se manipularon las variables de presión de 110, 130 psi, peso 90, 110 gramos y porcentajes de humedad de 53, 62% (ver tabla 07).

Para tal efecto se determinó la humedad mediante la norma técnica peruana (NTP 209.264 – 2001) las que se detallan en el anexo 01; las muestras fueron analizadas a las fibras de *Agave* después del secado del lecho fluidizado, en la que se obtuvo un promedio de 5.94% humedad de tres réplicas las que se utilizaron para los

cálculos de balance de materia con las que se determinaron los porcentajes de 53 y 62% humedad.

3.6.8 Filtrado

Esta operación consistió en separar las fibras de *Agave* las que se encontraban mezclados con el agua; para lo cual se utilizó una tela fina con la que se filtró por gravedad quedando las fibras retenidas en la tela; a las que se les ejerció una presión manualmente.

3.6.9 Secado

Esta operación tuvo como objetivo eliminar el agua de la fibra del *Agave* hasta mantener un peso constante, las fibras antes del secado fueron deshilachadas y extendidas para dar mayor facilidad la transferencia de calor; esta operación se llevó a cabo en el equipo de lecho fluidizado a una temperatura de 40 – 45 °C por un periodo de una hora.

3.6.10 Picado II

El proceso del picado (II) a tamaños de 0.2 a 0.5 cm se realizó con la finalidad de dar facilidad durante la molienda debido a la dureza que presenta la fibra. Este proceso se realizó después del secado de la fibra del maguey en el lecho fluidizado.

3.6.11 Molienda

La molienda se realizó en un molino de disco, con la finalidad de poder reducir a partículas pequeñas, debido a la dureza de la fibra de *Agave americana* se molieron

en dos etapas; la primera fue con una malla de 1 mm y la segunda con una malla (N° 35) de 0.5 mm.

3.6.12 Envasado

El envasado tuvo como finalidad de no permitir la absorción de agua de la humedad relativa existente en el medio ambiente, de forma que la fibra de *Agave* fue envasado en envases de 500 ml de polietileno de alta densidad las que son impermeables a la humedad relativa del medio.

3.6.13 Cuantificación de FDN, FDA y LDA

La evaluación de FDN y FDA se determinaron por el método de (Ankom, 2008) y LDA por la metodología descrito por (Vilcanqui, 2009), las que se detalladas en los anexos 02, 03, 04.

3.6.14 Selección de tratamiento

Para la selección de una unidad experimental de mayor resultado de FDN, en los métodos de extracción hidrotérmico y expansión por explosión se sometió a un análisis estadístico con la ayuda del programa de SPSS versión 19 en la que se analizó el ANOVA y la comparación múltiple de medias (Tukey), para la identificación del mejor tratamiento las que fueron de una gran ayuda además de los criterios adicionales durante la operación como gasto de energía y el tiempo de extracción; las que facilitaron tomar una mejor decisión; en la que se seleccionó el tratamiento tres para el método de extracción hidrotermica y el tratamiento cuatro para método de extracción por expansión por explosión.

3.6.15 Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida se realizó con ácido sulfúrico diluido (H_2SO_4); a los tratamientos seleccionados de los métodos de extracción hidrotérmica y expansión por explosión.

La hidrólisis ácida se realizó a concentraciones de 2, 4 y 8% y tiempos de 30, 60 y 90 minutos, estos ensayos se realizaron en un autoclave cilíndrico en que la temperatura de operación fue de $121^{\circ}C$ equivalente a 18 Psi. El experimento se realizó en frascos esterilizables de 250 ml las que se introdujeron a razón de 1/30 (p/v) fibra/concentración de ácido, una vez alcanzada el tiempo de hidrólisis se descendió la presión para luego sustraer las muestras y luego llevar a un baño isotérmico con la finalidad de detener la reacción de la hidrólisis; se debe observar el estado del agua destilada dentro del autoclave puesto que si posee un color anaranjado es porque se han perdido azúcares por derrame o evaporación y si fuera el caso conviene repetir la experimentación (Cortinez, 2010).

3.6.15.1 Detoxificación

Para la detoxificación de las muestras hidrolizadas con el ácido sulfúrico diluido (H_2SO_4) en sus distintas concentraciones se realizó siguiendo la metodología de (Cortinez, 2010).

Esta metodología consistió en coger un vaso precipitado de 250 ml en que la muestra fue puesta para facilitar el proceso de neutralización con hidróxido de sodio (NaOH) a 2 M (molar), mediante una bureta graduable de 100 ml hasta alcanzar un pH entre 8 a 11 para luego proseguir con el filtrado por gravedad con papel filtro Watman N° 40.

3.6.16 Determinación de azúcares reductores

La determinación de azúcares reductores se realizó por el método de ácido dinitrosalicílico (DNS) siguiendo la metodología de (Ghose 1987, Dutta 2008), la que se detalla en el anexo 07.

3.7 Diseño estadístico

El diseño estadístico se realizó en dos etapas, la primera corresponde a los procesos de extracción de expansión por explosión e hidrotérmica, donde las variables independientes fueron presión, peso, porcentaje de humedad y temperatura, tiempo, relación materia prima y agua (p/v) respectivamente; las que se evaluaron en función a la variable de respuesta de FDN.

Mientras la segunda etapa consiste en evaluar la cantidad de azúcares reductores después del proceso de hidrólisis ácida diluida a los tratamientos seleccionados del método I y II, en la que se manipularon las variables independientes de tiempo y concentración de ácido sulfúrico (H_2SO_4) en donde la variable de respuesta fueron los azúcares reductores (AR).

El análisis estadístico se utilizó para las dos etapas de la experimentación, en la que se efectuó un análisis de varianza (ANOVA), y posteriormente se determinó la comparación múltiple de medias (Tukey) con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, estos análisis se realizaron con la ayuda de un paquete estadístico (SPSS versión 19).

En el presente trabajo de investigación se utilizó el diseño factorial con tres replicas, enmarcados en los tratamientos de extracción de expansión por explosión, hidrotérmico y en el proceso de la obtención de azúcares reductores; las que se

muestran en las tablas 06, 07, 08 con sus correspondientes factores y niveles de cada proceso.

Tabla 06. Diseño factorial de (2x2x2) para la extracción hidrotérmico.

Variables	Niveles							
Temperatura (°C)	90				80			
Tiempo (minutos)	15		10		15		10	
Fibra/ Relación agua (P/V)	1:2	1:1	1:2	1:1	1:2	1:1	1:2	1:1
N: Número de tratamiento	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈
r: Número de repeticiones	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	2	2	2	2	2	2	2
	3	3	3	3	3	3	3	3

Tabla 07. Diseño factorial (2x2x2) para la extracción de expansión por explosión.

Variables	Niveles							
Presión (PSI)	110				130			
Peso de la fibra (g)	110		90		110		90	
Porcentaje de humedad (%)	62	53	62	53	62	53	62	53
N: Número de tratamiento	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈
r: Número de repeticiones	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	2	2	2	2	2	2	2
	3	3	3	3	3	3	3	3

Tabla 08. Diseño factorial de (3x3) para la hidrólisis ácida tanto para el tratamiento de expansión por explosión e hidrotérmico.

Variables	Niveles								
Tiempo (minutos)	30			60			90		
Concentración de ácido sulfúrico (%)	2	4	8	2	4	8	2	4	8
N: Numero de tratamientos	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈	T ₉
r: Numero de repeticiones	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	3	3	3	3	3	3	3	3	3

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción de la fibra de *Agave americana* por diferentes métodos

4.1.1 Concentración de la fibra extraída por el método I (hidrotérmico)

Los valores obtenidos del contenido de fibra después del proceso del tratamiento hidrotérmico (método I) se observan en la tabla 09; tratados en distintas condiciones de temperaturas de 80 y 90 °C, tiempos de 10, 15 minutos y relación de materia prima/agua 1:1,1:2 (p/v).

Tabla 09. Resultados de la fibra del *Agave americana* después del tratamiento hidrotérmico.

Temperatura °C	Tiempo (min)	Relación (p/v)	Tratamiento	Contenido de fibra extraída por método I (%)				
				FDN	FDA	LDA	Celulosa	Hemicelulosa
90	15	1:2	T ₁	71,21 ± 3,72 a	50,18 ± 1,80 bc	3,55 ± 0,30 bcd	46,62 ± 1,97 abc	21,03 ± 3,34 a
		1:1	T ₂	70,77 ± 0,20 a	52,31 ± 1,35 ab	2,66 ± 0,69cd	49,64 ± 1,90 a	18,46 ± 1,52 ab
	10	1:2	T ₃	67,83 ± 0,31ab	52,48 ± 0,90ab	2,38 ± 0,24d	50,09 ± 1,05 a	15,36 ± 0,62 b
		1:1	T ₄	66,30 ± 1,00b	49,81 ± 1,60 bc	4,12 ± 0,11bc	45,68 ± 1,50bc	16,49 ± 1,46 ab
80	15	1:2	T ₅	58,65 ± 1,42 c	53,82 ± 0,89a	5,87 ± 0,81 a	47,94 ± 0,80 abc	0,76 ± 0,58 d
		1:1	T ₆	54,57 ± 1,54 cd	51,44 ± 0,99abc	2,29 ± 0,90 d	49,15 ± 0,83 ab	7,21 ± 2,54 c
	10	1:2	T ₇	52,92 ± 0,27 de	49,92 ± 0,73bc	4,40 ± 0,31 ab	45,52 ± 0,45 c	3,00 ± 0,85 cd
		1:1	T ₈	49,41 ± 0,35 e	48,64 ± 0,28c	3,64 ± 0,29 bcd	45,00 ± 0,54 c	0,77 ± 0,09 d

*Media ± Desviación estándar; n = 3, P ≤ 0.05, T = tratamiento

Los datos obtenidos de FDN en la extracción hidrotérmica varían desde 49.41% a 71.21%, estos resultados se atribuyen a las condiciones de manipulación de los factores en estudio tales como temperatura, tiempo y relación (materia prima/agua).

En el análisis multifactorial (ANOVA) se observa que en los factores de temperatura, tiempo y la interacción tiempo*relación; presentan una influencia altamente significativa sobre las medias de FDN (p<0.01) por lo que se hace

imprescindible considerar estos dos factores para estudios adicionales; la combinación temperatura*tiempo*relación presenta una diferencia significativa ($p < 0.05$).

Sin embargo la relación materia prima/agua y interacción temperatura*tiempo, temperatura*relación no tiene una influencia significativa ($p > 0.05$); las que se observan en la tabla 05 del anexo 02.1.1.

Valiño *et al.*, (2004), realizaron estudios al bagazo de caña provenientes de la central azucarera “Amistad con los Pueblos” de la Habana a la materia seca del bagazo, con un tamaño de partícula de 0.1 - 0.5 mm sometida a una temperatura de 121 °C/1 h en una solución de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 5%, la que reportó para fibra neutro detergente valores entre 88.7 - 88.86%, para fibra ácida detergente 61.64 - 61.79%, celulosa 47.67 - 47.71%, y hemicelulosa 27.49 - 28.53%, estos resultados son superiores a los obtenidos en nuestro estudio por efecto de la temperatura, tiempo y relación (materia prima/agua) durante la extracción hidrotérmica, en la que se alcanzando un máximo rendimiento de 71.21% FDN como se muestra en la tabla 09. En la figura 11 se observa el resultado del tratamiento seleccionado en el método hidrotérmico en sus componentes de FDN, FDA y LDA.

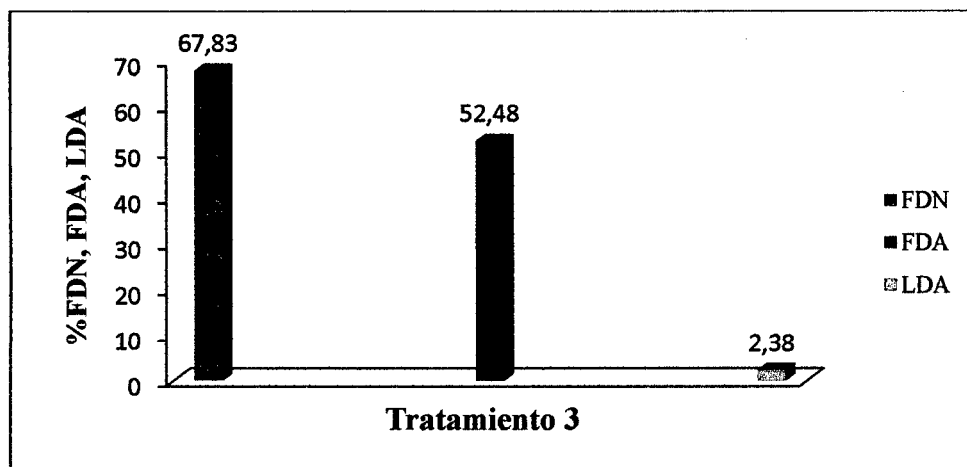


Figura 11. Resultados del tratamiento seleccionado en el método hidrotérmico.

La composición química de la fibra de *Agave americana* fue estudiado por Thamae *et al.*, (2008), quien obtuvo una concentración de 88% FDN, 72% FDA y 12% LDA; mientras Sarah *et al.*, (2011), en la misma especie reporta valores de 88.9% FDN, 72.9% FDA y 4.9% LDA. Estos valores comparados con la presente investigación resultan superiores en 20.17 – 21.07% de FDN y 19.52 - 20.42% de FDA con respecto al tratamiento seleccionado, esta diferencia es debido a que los datos reportados en la presente investigación fueron tratados previamente con las variables de temperatura 80, 90 °C, tiempo 10, 15 min y relación 1:1,1:2 (p:v), en efecto a estas condiciones tratadas la hemicelulosa sufre degradaciones a compuestos monoméricos de pentosas y hexosas, parte de la celulosa a glucosa por la que influyen en el rendimiento de la concentración de FDN y FDA; los datos teóricos reportados por Thamae *et al.* (2008); Sarah *et al.* (2011), se analizaron sin ningún tratamiento adicional que repercutan en el resultado de su composición química del *Agave*.

Sin embargo, Iñiguez *et al.*, (2005), en su investigación de subproductos en la industria tequilera reporta las características químicas del bagazo de *Agave* en base

seca quien obtuvo una cantidad de 58.8% FDN y 46.70% FDA y valores de 41.90%, 12.10%, 7.20% de celulosa, hemicelulosa y lignina, resultando inferior al tratamiento seleccionado de la investigación en 9.03% FDN y 5.78% FDA, estas diferencias entre los valores reportados y valores obtenidos en el estudio; resultan probablemente debido a las modificaciones químicas que ocurre durante el proceso de la obtención de tequila .

4.1.2 Concentración de la fibra extraída por el método II (expansión por explosión)

Los valores obtenidos de FDN, FDA, LDA, celulosa y hemicelulosa se muestran en el tabla 10, después del tratamiento de expansión por explosión en sus distintas combinaciones de sus factores así como presión a 110 y 130 psi, peso de la fibra de *Agave* 90, 110 g y humedades 53, 62%.

Tabla 10. Resultados de la fibra del *Agave americana* después del tratamiento por explosión por expansión.

Presión (psi)	Peso (g)	Humedad (%)	Tratamiento	Contenido de fibra extraída por método II (%)				
				FDN	FDA	LDA	Celulosa	Hemicelulosa
110	110	62	T ₁	55,43 ± 0,77bcd	54,93 ± 0,50 a	12,80 ± 0,61b	42,13 ± 1,04b	0,50 ± 0,18c
		53	T ₂	54,84 ± 0,23d	52,97 ± 0,29bc	9,10 ± 0,81c	43,87 ± 0,68b	1,85 ± 0,12b
	90	62	T ₃	56,29 ± 0,47bc	55,60 ± 0,36a	17,50 ± 0,99a	38,09 ± 1,34c	0,69 ± 0,20c
		53	T ₄	58,60 ± 0,50a	55,13 ± 0,69a	18,40 ± 0,89a	36,72 ± 1,02c	3,48 ± 0,45a
130	110	62	T ₅	56,63 ± 0,41b	53,18 ± 0,37bc	8,42 ± 0,30c	44,76 ± 0,40b	3,45 ± 0,44a
		53	T ₆	53,22 ± 0,06e	52,12 ± 0,01c	1,23 ± 0,07d	50,89 ± 0,09a	1,10 ± 0,06bc
	90	62	T ₇	55,18 ± 0,05cd	54,64 ± 0,33ab	2,14 ± 0,04d	52,49 ± 0,44a	0,54 ± 0,36c
		53	T ₈	54,77 ± 0,82d	53,18 ± 0,85bc	2,25 ± 0,68d	50,93 ± 1,71a	1,58 ± 0,24b

*Media ± Desviación estándar; n = 3, P ≤ 0.05, T= tratamiento

En la tabla 10 se pueden observar los resultados obtenidos de las fibras del *Agave americana* después del tratamiento de expansión por explosión, en sus componentes de FDN, FDA y LDA.

Los tratamientos con mayor y menor rendimiento de FDN; resulta inversamente proporcional a los resultados obtenidos de celulosa, debido a que a mayor FDN resulta menor celulosa o viceversa; la concentración de mayor FDN resulta 58.60% con una cantidad de celulosa de 36.72% y menor FDN 53.22% con una cantidad de celulosa 50.89%; por lo tanto el método de expansión por explosión implica que a menor presión, peso y humedad resulta mayor cantidad de FDN, en estas condiciones de tratamiento se observa que la lignina no sufre ningún cambio físico; por el contrario parte de la celulosa, hemicelulosa es descompuesta la que afecta en el rendimiento de la FDN. Esta tendencia de reducción de lignina y hemicelulosa es debido a que comienza a disolverse a una temperatura de 180 °C a condiciones neutras Sukumaran *et al.* (2009). Por otra parte la lignina es considerada también como un polímero termoplástico debido a su resistencia de aproximadamente hasta los 90 °C, y alcanzando derretirse a una temperatura de 170 °C Maya y Sabu (2008).

Para medir el efecto de cada uno de los factores en estudio, los resultados se analizaron estadísticamente mediante el ANOVA multifactorial, en donde la interacción de los factores presión, peso y humedad tienen una alta influencia significativa ($p < 0.01$) sobre las medias de FDN, al igual que las combinaciones presión*peso, presión*humedad y peso*humedad, sin embargo la interacción de

presión*peso*humedad no tiene una influencia significativa ($p>0.05$) sobre las medias de FDN las que se detallan en tabla 10 del anexo 02.2.1.

En la figura 12, se observa el resultado del tratamiento seleccionado en el método expansión por explosión en sus componentes de FDN, FDA y LDA.

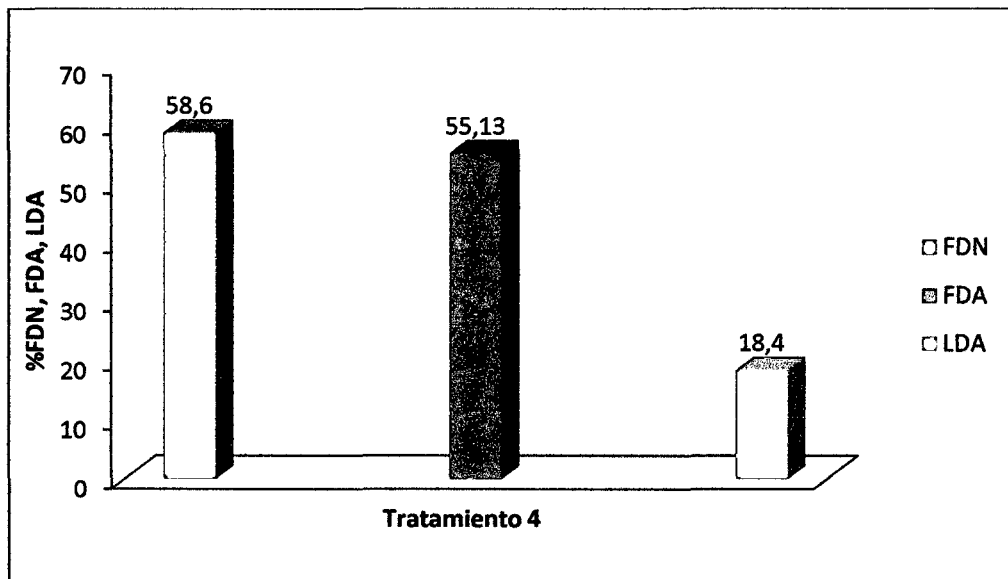


Figura 12. Resultados del tratamiento seleccionado por el método de expansión por explosión.

Por otro lado Rojas, (2004), indica que en el residuo de paja de trigo obtuvo una concentración de 70.39% FDN; también estudios realizados en la misma materia prima reportan valores de 70.5, 48.8, 31.1, 21.7, 8.3% de FDN, FDA, celulosa, hemicelulosa y lignina respectivamente Rios, (2008); los valores obtenidos en la presente investigación resultan inferiores en la concentración de FDN y en la hemicelulosa pero superando en la concentración de FDA y celulosa, estas diferencias en cuanto a su composición química es debido a que provienen de dos materias primas diferentes.

La composición química del bagazo de caña, han sido estudiados por diversos autores, según Espitia, (2010) quien realizó su estudio a los residuos agroindustriales; reporta el análisis químico en el bagazo de caña en la que obtuvo una concentración de 73.7% FDN, 50.8% FDA, lignina 8.06% y celulosa 42.7%. Mientras que Cataño, (2009) reportó 73.68% FDN, 50.78% FDA y lignina 8%; estos valores superan a los obtenidos en el proceso de la investigación en la que solo se obtuvo 58.60% FDN.

Como se puede observar en la tabla 10, la concentración de FDN supera a lo reportado por Íñiguez *et al.* (2011), quien estudió a las fibras de *Agave tequilana weber* las que provienen de dos industrias tequileras “La Cofradía” y “La Regional” ubicadas en Calisto México en la que reportó para la industria cofradía una concentración de FDN, FDA, LDA de 55.33, 47.40, 32.31% y celulosa, hemicelulosa 14.26, 7.94% respectivamente para la región FDN, FDA, LDA 57.80, 42.95, 28.79%, celulosa 14.16%, hemicelulosa 14.95%. Por otro lado Flores, (2009) también realiza estudios en la misma industria tequilera en la que reporta para la industria “Cofradía” las concentraciones de FDN, FDA, LDA 57.80, 47.39, 33.13%; para la “Region” 57.80, 42.95, 28.79% de FDN, FDA, LDA la que también fue superada por la presente investigación en la concentración de FDN en la que alcanzó un rendimiento máximo de 58.60% FDN.

4.2 Selección de tratamientos en los diferentes métodos de extracción

4.2.1 Selección del tratamiento en el método I (hidrotérmico)

Para la selección del mejor tratamiento en función a la concentración de FDN, se efectuó la comparación múltiple de medias (prueba de Tukey), a un nivel de

significancia de $\alpha=0.05$, reportando los valores mayores de FDN en los tratamientos T_1 , T_2 y T_3 como se observan en la figura 13 de las cuales el tratamiento uno resulta con el valor más alto alcanzando una concentración de 71.21%, a pesar de ello no presenta una diferencia estadística significativa a los otros dos tratamientos como se observa en la figura 13, siendo una ayuda para poder tomar una mejor elección frente a estos tres tratamientos; para lo cual se debe considerar criterios adicionales como gasto de energía y el tiempo de operación ya que a mayor tiempo implica mayor gasto de energía. Por consiguiente para este método de extracción, se seleccionó el tratamiento tres con las variables 90 °C de temperatura, con tiempo de 10 minutos y 1:2 (p/v) de relación materia prima/agua (M: H₂O) en la que resulto una cantidad de fibra detergente neutra de 67.83%.

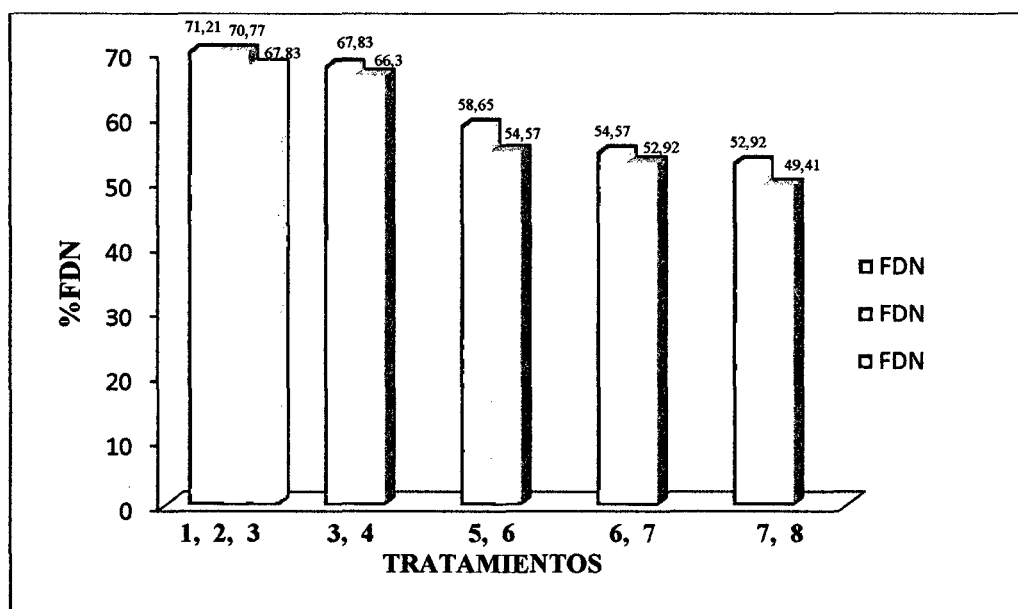


Figura 13. Comparación estadística al método hidrotérmico en función a la FDN.

En consecuencia en la tabla 11 se muestra el análisis químico de la fibra del *Agave americana* después del proceso hidrotérmico; este análisis corresponde al

tratamiento tres que fue seleccionado por la mayor cantidad de FDN y menor gasto de energía durante la operación del trabajo.

Tabla 11. Análisis químico a la fibra de *Agave americana* después del tratamiento hidrotérmico.

Análisis ^T	Fibra de <i>Agave americana</i> ($a \pm S$)
Fibra detergente neutra (%FDN) ^(bs)	67,83 \pm 0,31
Fibra detergente ácida (%FDA) ^(bs)	52,48 \pm 0,90
Lignina ácida detergente (%LDA) ^(bs)	2,38 \pm 0,24
% Celulosa ^(bs)	50,09 \pm 1,05
%Hemicelulosa ^(bs)	15,36 \pm 0,62
%Lignina ^(bs)	2,38 \pm 0,24

^aPromedio del análisis por triplicado de la muestra. ^{bs}base seca. ^SDesviación estándar. ^TTratamiento seleccionado

Los resultados obtenidos en el analisis quimico de la fibra de *Agave americana* despues del proceso hidrotérmico resultan en los polimeros de celulosa (50.09 \pm 1.05), hemicelulosa (15.36 \pm 0.62) y lignina (2.38 \pm 0.24)%; estos resultados obtenidos en el estudio de investigación son superiores en la celulosa y no así en la hemicelulosa y lignina en las diferentes biomásas reportadas por diversos autores tales como Saucedo *et al.*, (2010), quien reporta la composición química del bagazo de *Agave tequila weber*, celulosa (42 \pm 2), hemicelulosa (20 \pm 1), lignina (15 \pm 1) % en base seca. En efecto Gómez, (2008) hizo un estudio al material lignocelulósico de la avena en la que obtuvo 38% celulosa, 21.5% hemicelulosa y 4.6% lignina en base seca. Mientras Cardona *et al.*, (2010), hacen mención de la composición del bagazo de caña de azúcar, que está formado principalmente de celulosa (40 - 45) %, hemicelulosa (30 - 35) % y lignina (20 - 30) %. Romeo, (2010), menciona la composición de poda de olivo, celulosa (30.6 \pm 0.8), hemicelulosa (23.2 \pm 0.8) y lignina (3.5 \pm 0.2) %.

Por otro lado Sarah *et al.*, (2011) reporta resultados de la fibra de hojas de *Agave americana* en sus distintos componentes de celulosa 68%, hemicelulosa 16% y lignina 4.9%. Estos resultados obtenidos son superiores a las que se obtuvieron en el proceso de investigación en un margen de 17.91% de celulosa y 0.64% hemicelulosa; esta diferencia es debido a que las fibras del *Agave americana* reportados por Sarah *et al.*,(2011) son resultados sin ninguna modificación física y química; a pesar de la diferencia de los polímeros resulta siendo beneficioso el tratamiento hidrotérmico debido a que disminuye la cantidad de lignina en un 2.52% frente al valor teórico reporta por Sarah *et al.*,(2011).

4.2.2 Selección del tratamiento en el método II (expansión por explosión)

En consecuencia se efectuó la comparación múltiple de medias (prueba de Tukey), a un nivel de significancia de $\alpha= 0.05$, para la selección del mejor tratamiento en función a la fibra detergente neutra (FDN), en las que se encontró cinco grupos de los ocho tratamientos; siendo el tratamiento cuatro con el valor más alto de FDN, con las variables de presión 110 (psi), con peso de 90g (fibra de *Agave*) y una humedad de 53%, que dieron un resultado de 58.60% de FDN valor que difiere significativamente con las otras medias de los siete tratamientos como se observa en la figura 14.

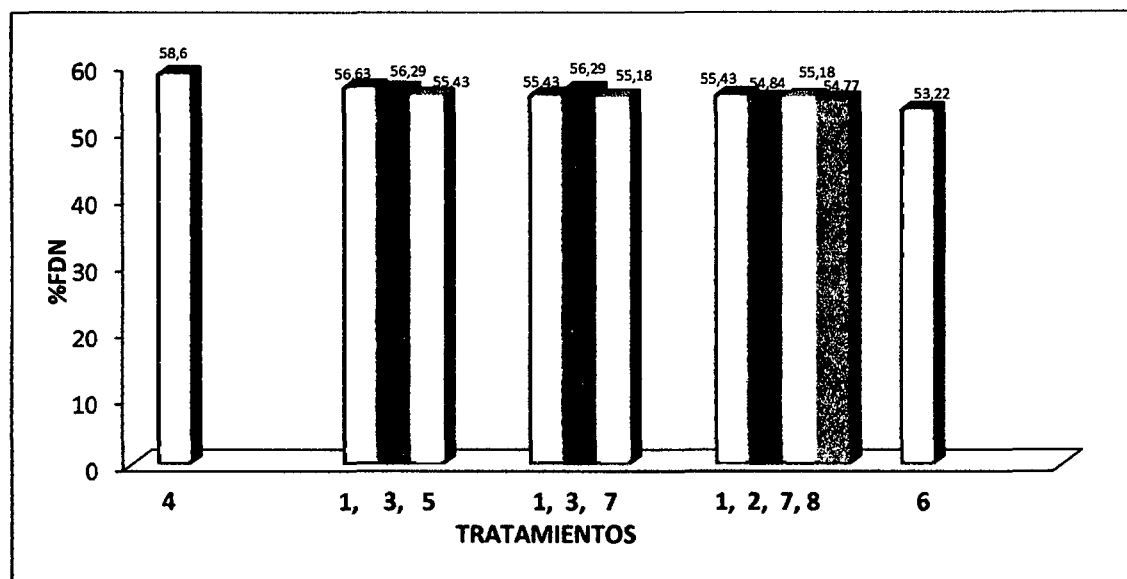


Figura 14. Comparación estadística a los tratamientos de expansión por explosión en función al %FDN.

El análisis químico que se observa en la tabla 12, es el resultado del tratamiento cuatro quien obtuvo la mayor concentración de FDN después del tratamiento de expansión por explosión cuyas variables de estudio fueron presión, peso y porcentaje de humedad mencionadas anteriormente.

Tabla 12. Análisis químico de la fibra de *Agave americana* después del tratamiento de expansión por explosión.

Análisis ^T	Fibra de <i>Agave americana</i> (a±s)
Fibra detergente neutra (%FDN) ^(bs)	58,60 ± 0,50
Fibra detergente ácida (%FDA) ^(bs)	55,13 ± 0,69
Lignina ácida detergente (%LDA) ^(bs)	18,40 ± 0,89
% Celulosa ^(bs)	36,72 ± 1,02
%Hemicelulosa ^(bs)	3,48 ± 0,45
%Lignina ^(bs)	18,40 ± 0,89

^aPromedio del análisis por triplicado de la muestra. ^{bs}base seca. ^sDesviación estándar. ^TTratamiento seleccionado

La composición química del bagazo de caña de azúcar reportado por Hernández *et al.*, (2009) resulta 50, 25, 25% de celulosa, hemicelulosa y lignina; quien también hace referencia al bagazo de *Agave tequilana weber* en sus componentes de celulosa, hemicelulosa, lignina obteniendo (43, 19 y 15) %, en consecuencia. Escamilla, (2011), quien hace referencia a la misma especie reporta (65, 5.3, 16) % celulosa, hemicelulosa y lignina mientras que Balam *et al.*, (2006) estudiaron diferentes *Agaves* entre ellas el *Agave tequilana* reportando valores similares en las hojas y tronco de 64.8, 5.3 y 16.4% para celulosa, hemicelulosa y lignina reporta para *Agave fourcroydes* 77.6, 7, 13.1%; *Agave sisalana* 73.1, 13.3 y 11% respectivamente. Estudios realizados a la paja brava por Usnayo, (2007) reportan una composición química 54.13%, 13.04%, 22.89% de celulosa, hemicelulosa y lignina.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación fueron inferiores a los datos teóricos reportados por los distintos autores mencionados anteriormente de las diferentes materias primas, la diferencia entre los datos obtenidos y el bagazo de caña resulta 13.28%, 21.52%, *Agave tequilana weber* 6.28%, 15.52%, paja brava 17.72%, 9.56% de celulosa y hemicelulosa respectivamente. Esta diferencia de composición química a raíz de ser de diferentes residuos lignocelulósicos, es debido a aplicación del método de expansión por explosión en las que se manipularon las variables de presión, peso y humedad, estas variables son los que generan cambios químicos también físicos, las que repercuten en los componentes de la celulosa y hemicelulosa; debido a una hidrólisis en cada uno de estos polímeros en especial en la hemicelulosa; los cambios físicos en la fibra de *Agave americana* se generan por la caída de presión, generando quiebres en su estructura de la fibra.

Por otro lado diversos autores estudiaron la composición química de las diferentes materias primas lignocelulósicas así como Badal, (2003) quien hace mención sobre la composición química de la fibra de maíz (celulosa 15%, hemicelulosa 35%, lignina 8%), paja de arroz (celulosa 35%, hemicelulosa 25%, lignina 12%), paja de trigo (celulosa 30%, hemicelulosa 50%, lignina 20%); también Triana, (2010) hace referencia en los tallos de café en la que obtuvo cantidades de celulosa 40 – 50%, hemicelulosa 16 – 20%, y lignina 20 – 30% y por otro lado Xuebing *et al.*, (2008), hace referencia la composición química del tallo de la mala hierba (*crofton Eupatorium*) en la que reporta 37.14% celulosa, 29.08% hemicelulosa y 16.42% lignina y Monsalve *et al.*, (2006), obtuvo 13.2, 14.8, 14% de celulosa, hemicelulosa y lignina en la cascara de banano. En el estudio realizado se obtuvo datos similares en cuanto a la celulosa e inferiores en la hemicelulosa, estas diferencias se deben a que provienen de distintos residuos lignocelulósicos.

Por otro lado Thamae *et al.*, (2008), reporta la composición química de la fibra de *Agave americana* quien obtuvo 66 – 72% celulosa, 10 – 14% hemicelulosa y 12% lignina; donde Mylsamy y Rajendran, (2011), también obtiene resultados similares de celulosa 68.42%, hemicelulosa 15.67% y lignina 4.85%, siendo superiores al tratamiento seleccionado (T_4) en el método de expansión por explosión, en la que se alcanzó obtener 36.72% celulosa, 3.48% hemicelulosa, 18.40% lignina, esta diferencia es debido a la degradación de los polímeros a componentes más simples, por la aplicación de un tratamiento físico en las que se manipularon las variables de presión, peso y porcentaje de humedad.

4.3 Hidrolisis ácida diluida al tratamiento seleccionado de extracción hidrotermica y expansión por explosión

4.3.1 Hidrolisis ácida diluida al tratamiento seleccionado del proceso de extracción hidrotermica

En la tabla 13, se muestran las concentración de azúcares reductores (AR), las que se obtuvieron por un proceso de hidrolisis ácida diluida de las fibra de *Agave americana*; que previamente fue tratada por el método hidrotérmico en la que fue seleccionada el tratamiento tres (T₃), con la finalidad de dar mayor accesibilidad al ácido y obtener mejores resultados durante la hidrolisis; los valores reportados de azúcares reductores después de la hidrolisis ácida diluida oscilan de 6.23 a 9.28 g/L (AR), las que fueron tratadas a diferentes tiempos, concentraciones y a una temperatura constante de 121 °C.

Tabla 13. Obtención de azúcares reductores por hidrolisis ácida diluida después de la extracción hidrotermico.

Tratamiento	Tiempo (minutos)	Concentración (H ₂ SO ₄) %	Temperatura °C	Azúcar reductor (AR) (g/L) (a±s)
T ₁	30	2	121	6,23 ± 0,11e
T ₂		4	121	8,27 ± 0,18c
T ₃		8	121	9,28 ± 0,31a
T ₄	60	2	121	7,55 ± 0,07d
T ₅		4	121	8,41 ± 0,26bc
T ₆		8	121	9,18 ± 0,29a
T ₇	90	2	121	8,04 ± 0,18cd
T ₈		4	121	8,47 ± 0,09bc
T ₉		8	121	8,95 ± 0,40ab

^a Promedio del análisis por triplicado de la muestra. ^b Desviación estándar. P ≤ 0.05.

Cardona *et al*, (2010) realizaron una hidrólisis al bagazo de caña de azúcar, cuya concentración de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1.25%, temperatura 121 °C, tiempo de 2 horas; con una carga de biomasa de 10% (w/w), consiguiendo una concentración de azúcares totales de 59.1 g/L; como se puede observar en la tabla 13, el resultado obtenido de azúcares reductores en la presente investigación es inferior a lo reportado por Cardona *et al*, (2010), esta superioridad es debido a que la composición química del bagazo de caña de azúcar es diferente a la del *Agave americana*; superando a la hemicelulosa en un 19.64%, donde el medio ácido tiene una mayor facilidad de hidrolizar a los polímeros sobre todo a la hemicelulosa ya que la celulosa es mucho más resistente al medio ácido. En efecto la conversión de azúcares fermentables se genera durante un proceso de hidrólisis ácida; logrando la conversión a azúcares reductores en 80.6% de hemicelulosa, 17.2% celulosa Romeo, (2010).

Mientras que Gómez, (2008), hidrolizó la paja de avena previamente molida; con una proporción de 50 g/L (paja de avena: solución de ácido clorhídrico (HCl)); con una temperatura de 90 °C, tiempo 2 horas y una concentración de ácido clorhídrico al 2%, obteniendo resultados de azúcar reductor de 20978 mg/L medidos por método DNS; este resultado es superior a lo reportado en la presente investigación debido a que solo se alcanzó una cantidad de hidrolizado de azúcares reductores de 13921 mg/L en una proporción de 50 g/L fibra de *Agave*/solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4), al 8% y 30 minutos, estas diferencias obtenidas de azúcares reductores durante el hidrolizado es a consecuencia de sus diferentes componentes químicos que presentan cada materia prima.

Por otro lado también Gómez, (2008), hace mención de parámetros para el proceso de sacarificación de distintas materias primas como rastrojo de maíz (H_2SO_4 0.5%, 151 °C, 1 hora) reportando 286.5 mg AT/g residuo, bagazo de caña (H_2SO_4 : 1.25%, 121 °C, 2 horas) produciendo una cantidad 635 mg AT/g residuo.

Por otra parte se han realizado investigaciones como la de Saucedo *et al.*, (2010), quien realizó un estudio de optimización de hidrolisis ácida de bagazo de *Agave tequilana weber*, las que se adquirieron de las destilerías tequileras para tal efecto las fibras fueron lavadas con agua y secadas para luego ser molidas a diámetros de 0.5 mm las que se hidrolizaron a una relación de materia prima y concentración de ácido sulfúrico H_2SO_4 , 1:10 (p/v) en dos etapas , la primera fue con temperaturas de 100, 125, 150, 175, 200 ° C; tiempos de 10, 20, 30, 40 minutos y concentraciones de ácido sulfúrico 1, 2% obteniendo el mejor resultado a 150 °C, 2% H_2SO_4 y 10 minutos con un rendimiento de 236 g/kg de materia seca y una concentración de 26.9 g/L. la segunda etapa fue a temperaturas de 150, 175, 200 °C; tiempos 10, 20, 30, 40 minutos y concentraciones de ácido sulfúrico 1, 2%, en la que obtuvo el rendimiento más alto a una temperatura de 175 °C, 2% H_2SO_4 y 30 minutos reportando 90 g/kg de materia seca y una concentración de 15 g/L.

En el trabajo realizado las fibras de *Agave americana* fueron secadas y molidas a tamaños de partículas de 0.5 mm después del proceso hidrotérmico, las mismas que fueron hidrolizadas a una relación de 1:30 (p/v); los factores en estudio fueron tiempo 30, 60, 90 minutos, concentración de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2, 4, 8% y una temperatura constante de 121 °C para todos los tratamientos, de los cuales el mejor

resultado obtenido fue a las condiciones de 30 minutos, 8% (H_2SO_4) y una temperatura 121 °C la que reportó una concentración de azúcar reductor (AR) de 9.28 g/L con un rendimiento de 278.42 g/kg de muestra en base seca. Lo cual supera a la hidrólisis de la primera y segunda etapa realizada por Saucedo *et al.*, (2010); la diferencia de los resultados de azúcares reductores entre los datos teóricos y el proceso de investigación es debido a que mediante el tratamiento hidrotérmico sufren cambios físicos y químicos que ayudan en el proceso de hidrólisis ácida, por otro lado Romero *et al.*,(2010) enmarca en la importancia de la temperatura y concentración ácida debido a que tiene una importante influencia en la fibra que puede ser hidrolizada en su máxima producción.

Efectuando el ANOVA multifactorial resulta que los factores tiempo, concentración de ácido sulfúrico y la interacción tiempo*concentración; presentan una influencia altamente significativa sobre las medias de concentración de azúcares reductores (AR) ($p < 0.01$) por lo que se hace imprescindible usar estos dos factores para estudios posteriores (ver anexo 07.1.1 tabla 42).

Para la determinación estadística se llevó a cabo la comparación múltiple de medias (prueba de Tukey), a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ en la que se formaron cinco grupos de los nueve tratamientos como se puede observar en la figura 15, obteniendo los valores más altos los tratamientos tres, seis y nueve de los cuales el tratamiento tres obtiene el valor más alto con una concentración de azúcares reductores de 9.28 g/L y un menor consumo de energía lo cual genera menos gasto

económicamente frente a los tratamientos T₆, T₉; valor que no difiere significativamente de los tratamientos seis y nueve.

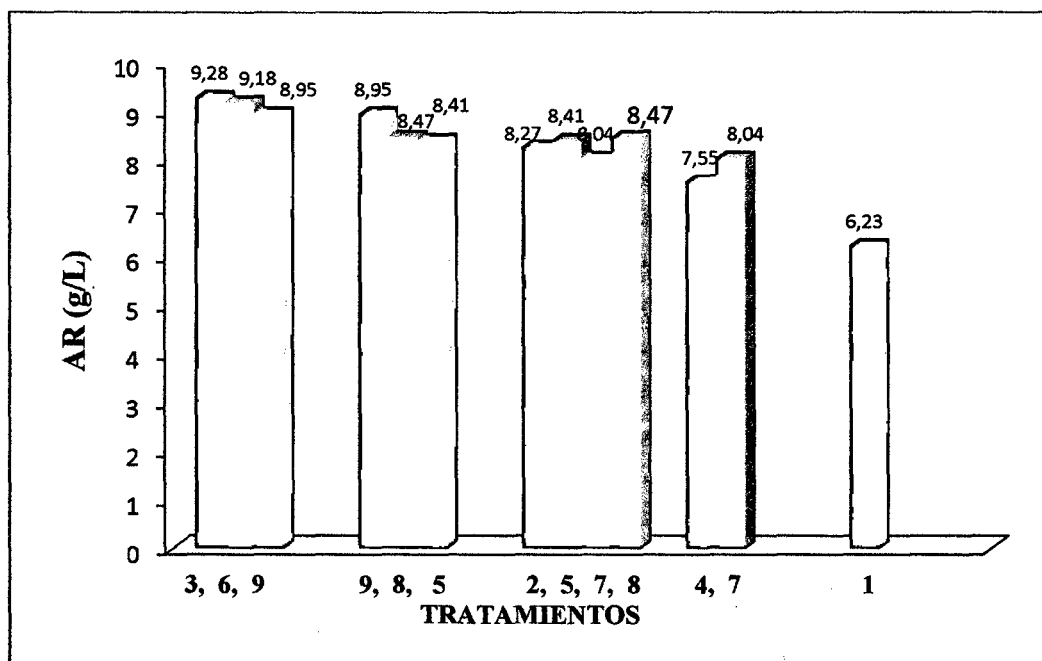


Figura 15. Comparación estadística de azúcares reductores después del proceso de hidrólisis anteriormente extraídas por el método hidrotérmico.

4.3.2 Hidrolisis ácida diluida al tratamiento seleccionado del proceso de extracción de expansión por explosión

El tratamiento tres fue seleccionado después del proceso de expansión por explosión la que fue hidrolizada a una proporción de 1/30 (p/v) de fibra de *Agave*/ concentración de ácido sulfúrico (H₂SO₄), a 2, 4, 8% (H₂SO₄), tiempos 30, 60, 90 minutos y a una temperatura constante de 121 °C, en la que se obtuvo resultados que variaron de 7.12 a 9.41 g/L como se observa en la tabla 14.

Tabla 14. Obtención de azúcares reductores por hidrolisis ácida diluida después de la extracción por expansión por explosión.

Tratamiento	Tiempo minutos	Concentración (H ₂ SO ₄) %	Temperatura °C	Azúcar reductor (AR)(g/L) (a±s)
T ₁		2	121	7,12 ± 0,09d
T ₂	30	4	121	8,54 ± 0,35b
T ₃		8	121	9,41 ± 0,35a
T ₄		2	121	7,70 ± 0,18c
T ₅	60	4	121	8,60 ± 0,04b
T ₆		8	121	9,24 ± 0,04a
T ₇		2	121	7,86 ± 0,12c
T ₈	90	4	121	8,62 ± 0,10b
T ₉		8	121	9,24 ± 0,10a

^a Promedio del análisis por triplicado de la muestra. ^b Desviación estándar. $\alpha = 0.05$

Según Hernández *et al.*, (2009) hidrolizo al bagazo de caña de azúcar quien utilizo tratamiento de vapor en un auto clave a 121 °C y una concentración de ácido clorhídrico 1.2% (HCl) y 1:5, 1:10, 1:15 (gramos de bagazo/ml de solución), durante un tiempo de 4 horas, para el proceso de hidrolisis ácida en el bagazo de caña de azúcar se tomó la relación de 1:15 (p/v) y las variables mencionadas anteriormente; en la que cedió un nivel más alto de azúcares reductores; para el bagazo de caña de azúcar sin medula 37.21% y 35.37% para bagazo de caña de azúcar con medula y para el bagazo de metzal 24.84 g/L y metzodonte 33.42 g/L, en la que se puede observar que existe una diferencia entre el bagazo de caña de azúcar y la fibra del bagazo de *Agave* a pesar de ser tratados en las mismas condiciones; así mismo Sánchez *et al.*, (2004) realizo estudios a la paja brava; quien hidrolizo en dos etapas la primera etapa hidrolizo a 190 °C, durante un tiempo de resistencia 10 minutos 0.5% H₂SO₄ en la que se obtuvo xilosa 0.209 (g/g), arabinosa 0.007(g/g), glucosa 0.025 (g/g) llegando a un porcentaje de azúcares totales de 24.1%, y para un tiempo

de 5 minutos xilosa 0.191 (g/g), arabinosa 0.007(g/g), glucosa 0.023 (g/g), resultando un 22.1% de azúcares totales; mientras a una temperatura de 200 °C, tiempo 3 minutos se obtuvo rendimientos de xilosa 0.191(g/g), arabinosa 0.009(g/g), glucosa 0.032(g/g) lo que hace la suma de azúcares de 0.232 g/g con un rendimiento de 23.2% de azúcares totales. En la segunda etapa de la hidrolisis utilizo una temperatura de 230 °C, 10 minutos y una concentración de 0.5% de ácido sulfúrico en la que la producción de glucosa fue 0.118 g/g, xilosa 0.094 (g/g), arabinosa 0.019 (g/g) la que obtuvo un total de azúcares 0.231(g/g) y un rendimiento en porcentaje de 23.8%.

En efecto en la presente investigación; antes de del proceso de hidrolisis ácida las fibras de *Agave americana* fueron molidas en un molino de disco a tamaños de partícula de 0.5 mm, las que fueron hidrolizadas a proporción de 1:30 (p/v) (peso de materia prima/ concentración en volumen), en que las variables en estudio fueron tiempos 30, 60, 90 minutos, concentración de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2, 4, 8%, a una temperatura constante de 121 °C como se puede observar en la tabla 14, en la que se obtuvo una máxima concentración de 9.41 g/L equivalente a un porcentaje de 28.23% de (AR), a condiciones de 30 minutos, 8% (H₂SO₄), 121 °C, el resultado obtenido en el trabajo de investigación supera a lo reportado por Sánchez *et al.*, (2004), esta diferencia es debido a que la fibra de la paja brava contiene una cantidad elevada de lignina de 22.89%, por lo que impide el fácil acceso de la solución ácida para el desdoblamiento a compuestos más simples, el trabajo es superior en 4% de azúcares reductores a pesar que después del tratamiento de expansión por explosión la fibra de *Agave* es inferior en sus componentes de celulosa y hemicelulosa de la que

se pueden deducir que existe daños físicos durante el tratamiento de expansión por explosión la que permite desarrollar una mejor obtención de azúcares reductores durante la hidrólisis ácida.

Frente a lo reportado por Hernández *et al.*, (2009), los valores encontrados en la presente investigación resulta inferior en 8.97, 7.13 y 5.18% de AR para el bagazo de caña de azúcar con medula, sin medula y bagazo de *Agave metzodonte* respectivamente y superior al bagazo de *Agave metzal* en 3.4% de AR, esta diferencia que presenta tanto el bagazo de caña de azúcar y el bagazo de *Agave* es a consecuencia de su composición química que presenta cada una de estas materias primas, así como el bagazo de caña de azúcar que tiene una mayor cantidad de hemicelulosa la que se hidroliza con mayor facilidad por ser un polímero disociado, mientras la celulosa presenta un grado de cristalinización que la hace más complicado durante la hidrólisis; por otra parte Ye Sun y Cheng, (2005) hace mención que el ácido sulfúrico diluido puede con eficacia solubilizar la hemicelulosa en azúcares de monoméricas (arabinosa, galactosa, glucosa, manosa, y xylosa) y oligómeros solubles.

La obtención de azúcares reductores fueron estudiados por diversos autores en distintas materias primas lignocelulósicas así como Triana, (2010), quien utiliza el ácido sulfúrico a una concentración de 2% (H_2SO_4) para la reacción de la sacarificación en los tallos de la planta de café, con una relación de 1/10 (p/v), tiempo de 4 horas, temperatura de 135 °C obteniendo un resultado de 33.41 g/L de azúcares reductores; mientras Xuebing *et al.*, (2008), estudia al tallo de la mala

hierba (*crofton Eupatorium*) las que fueron tratadas a temperaturas de 100, 110, 120 °C, tiempos 90, 120, 150 minutos, concentraciones de 1, 2, 3% (H₂SO₄) en una relación de 1/8 (p/v); reportando el mejor resultado de 32.89 g/L a condiciones de 120 °C, 120 minutos y 1% H₂SO₄.

La presente investigación reporta datos inferiores a los reportados por Triana, (2010) y Xuebing *et al.*, (2008), esta diferencia de resultados es debido a la temperatura, tiempo y concentración durante la hidrolisis. En consecuencia Shanti *et al.*, (2012), hace mención que la temperatura es uno de los parámetros más importantes para la degradación de azúcares; a temperatura inferior 100 – 140 °C es normalmente aplicable en la hidrolisis de hemicelulosa y temperaturas más altas como 180 – 250 °C equivale a la hidrolisis de celulosa.

Por otra parte Aguilar *et al.*, (2002), hidrolizo al bagazo de caña de azúcar con una relación de 1/10 (p/v), a temperatura de 122 °C, tiempo 24 minutos y una concentración de ácido sulfúrico 2% (H₂SO₄); en estas condiciones cedieron una cantidad de 21.6 g/L xilosa, 3 g/L glucosa; en la que reporta 24.6 g/L de azúcares totales. Por otro lado también trabajo la misma materia prima Laopaiboon *et al.*, (2010) quien hace una comparación de hidrolisis ácida, entre el ácido sulfúrico (H₂SO₄) y ácido clorhídrico HCl; en donde la relación de materia prima y la solución ácida fue de 1/15 (p/v) para ambos casos durante el proceso de hidrolisis, los datos reportados para la concentración de ácido sulfúrico al 0.5% (H₂SO₄), temperatura 110 °C y un tiempo de 4 horas, se obtuvo una cantidad de xilosa 12.64 g/L, glucosa 2.28 g/L, arabinosa 1.33 g/L, y azúcares totales de 16.25 g/L; en las mismas

condiciones trabajo para el HCl resultando una concentración de xilosa 15.16 g/L, glucosa 2.85 g/L, arabinosa 1.35 g/L, en la que se obtuvo 19.36 g/L, de azúcares totales. Otra de las materias primas hidrolizadas por Leenakul y Tippayawong, (2010), fue el bambú en donde se manipularon las variables de temperaturas de 120, 140 °C, tiempos de 30, 60, 90 minutos y a concentraciones de 0.6, 0.9, 1.2% (H₂SO₄), en la que obtuvo mejores rendimientos de glucosa 3.50 (g/100g), xilosa 14.92 (g/100g), con los parámetros de temperatura 140 °C, tiempo 90 minutos y a una concentración de 1.2% de (H₂SO₄). Todos estos resultados son inferiores a los reportados por la hidrólisis ácida diluida después del proceso de expansión por explosión la que se puede observar en tabla 14 la que alcanza un rendimiento de 28.23% de azúcar reductor. En efecto la liberación de azúcares aumenta con el aumento de la concentración ácida pero a su vez este disminuye a partir de entonces; esto se explica a que mas concentración ácida causa el aumento de liberación de algunos compuestos tóxicos o inhibidores (furfural y ácido acético) Laopaiboon *et al.*, (2010).

En la tabla 14, se observa los resultados de azúcares reductores (AR) que proviene de la combinación de los factores en estudio tiempo, concentración de ácido; valores que varían 7.12 hasta 9.41 g/L (AR). En efecto en el análisis multifactorial ANOVA se observa que el factor de concentración, tiene una influencia altamente significativa sobre las medias de AR ($P \leq 0.01$); por lo que se tiene que tomar mayor énfasis en la variable de concentración de ácido sulfúrico ya que durante el proceso de hidrólisis ácida tiene una alta influencia significativa en la degradación de polímeros a azúcares reductores; por otro lado también la

combinación de tiempo*concentración tiene una influencia significativa sobre las medias de AR ($P \leq 0.05$); sin embargo el tiempo no tiene una influencia significativa sobre las medias de (AR) $P \geq 0.5$ (ver anexo 07.2.1 tabla 47).

En la figura 16, se observa la comparación estadística de la hidrólisis ácida diluida en función a los azúcares reductores, obtenidas a partir de las fibras del *Agave americana* las que fueron tratadas anteriormente con el método de expansión por explosión; para la selección del mejor tratamiento se efectuó la comparación múltiple de medias (prueba de Tukey) a un nivel de significancia ($\alpha = 0.05$), reportando el tratamiento tres con el valor más alto de 9.41 g/L la cual no representa una diferencia significativa con los tratamientos seis y nueve a pesar de ello el tratamiento tres es elegido por consumir menor energía lo cual implica un menor gasto económico, por otro lado el tratamiento uno obtiene el menor resultado la que difiere significativamente de los otros siete tratamientos.

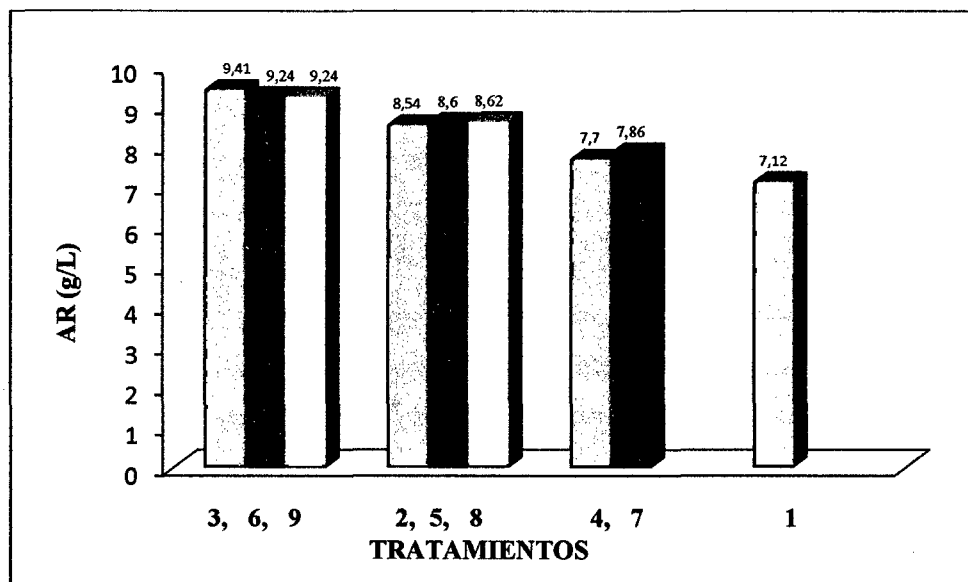


Figura 16. Comparación estadística de azúcares reductores después del proceso de hidrólisis anteriormente extraídas por el método de expansión por explosión.

4.4 Comparación de los métodos de extracción hidrotérmica y expansión por explosión

La extracción del método hidrotérmico resulta mayor en cuanto a su composición química de fibra detergente neutra (FDN), celulosa, hemicelulosa e inferior en lignina comparado con el método de expansión por explosión, esta diferencia de componentes químicos es debido a las variables utilizadas en cada uno de los métodos de extracción; durante el tratamiento hidrotérmico se solubiliza pequeñas cantidades de hemicelulosa y lignina; mientras que en el método de extracción de expansión por explosión la descomposición de los polímeros es mayor comparado con el método de extracción hidrotérmica la que repercute en la concentración de FDN. En la figura 17 se observa la comparación de los resultados químicos después del proceso de extracción hidrotérmica y expansión por explosión.

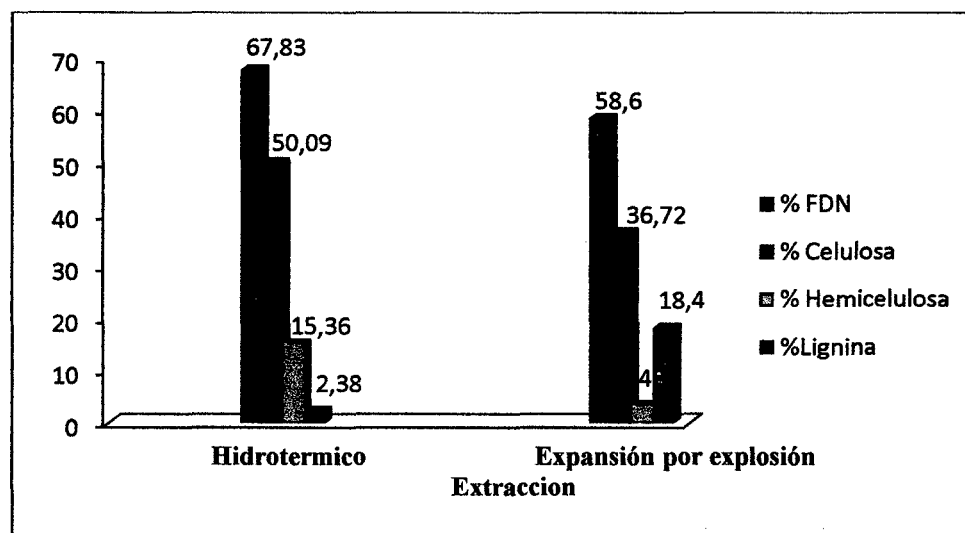


Figura 17. Comparación de la extracción hidrotérmica y expansión por explosión.

Por otro lado la extracción del método de expansión por explosión comparado con el método hidrotérmico resulta superior en la obtención de azúcares reductores a

pesar que resulta inferior en su composición química, este resultado es a consecuencia de que durante el tratamiento hidrotérmico no sufre cambios físicos que ayuden durante el proceso de hidrólisis a diferencia del método de expansión por explosión que si genera rupturas en los polímeros de la fibra del *Agave americana*, dando mayor facilidad al proceso de hidrólisis mediante el uso de ácido (H_2SO_4) para la producción de azúcares reductores. En la figura 18 se puede observar la comparación de los mayores rendimientos de azúcares reductores tras realizar la hidrólisis ácida a los métodos de extracción hidrotérmico y expansión por explosión.

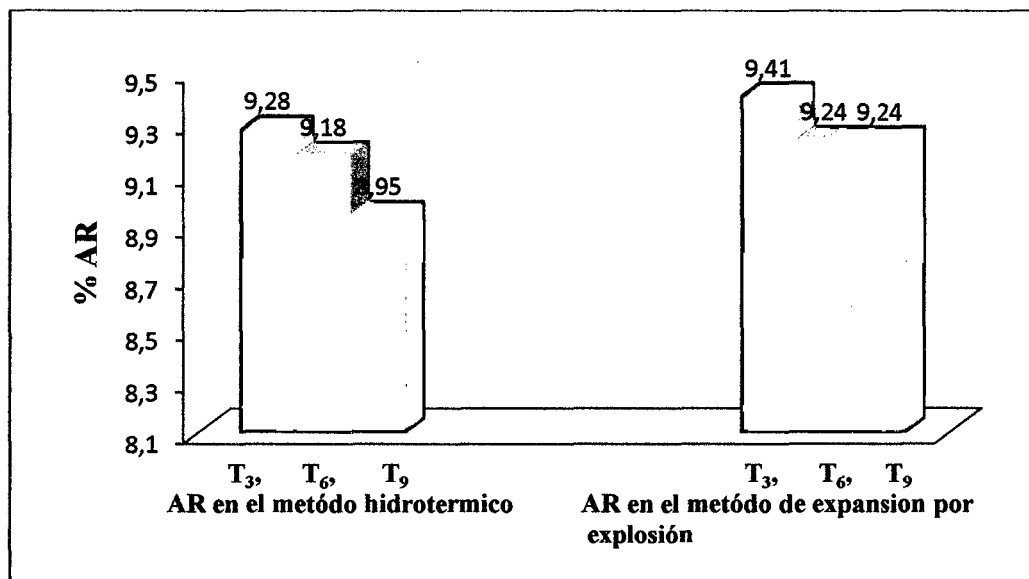


Figura 18. Comparación de AR en los métodos de extracción hidrotérmica y expansión por explosión.

Sin embargo al realizar una comparación múltiple de medias (Tukey) a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ a los seis mejores resultados de azúcares reductores obtenidas después del proceso de hidrólisis de ambos métodos de extracción; no presentaron diferencias estadísticas entre sí, como se pueden observar en el anexo 08 tabla 48.

V. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusión

El método de extracción hidrotérmico permitió concentrar mayor cantidad de fibra detergente neutra (FDN) con las variables de temperatura a 90 °C, tiempo 10 minutos y una relación de 1:2 (p/v) en la que se alcanzó obtener 67.83% de FDN la que se seleccionó para el proceso de hidrolisis.

En el método de expansión por explosión se obtuvo una concentración de fibra detergente neutra (FDN) de 58.60% con las variables de estudio de presión 110 psi, peso 90 g a un porcentaje de humedad de 53%; los que además fueron seleccionados para la hidrolisis ácida diluida por contener la mayor cantidad de FDN.

En el proceso de la hidrolisis ácida diluida a la fibra del *Agave americana* pretratada anteriormente por el método hidrotérmico, se obtuvo una concentración de 9.28 g/L de azúcares reductores obteniendo un rendimiento de 27.84% con las variables de estudio de 30 minutos, concentración de ácido (H₂SO₄) de 8% y para la hidrolisis ácida diluida realizada al tratamiento seleccionado de expansión por explosión, presento una concentración de azúcares reductores de 9.41 g/L con un rendimiento de 28.23%, a condiciones de 30 minutos y a una concentración de 8% de ácido sulfúrico (H₂SO₄).

5.2 Recomendaciones

Hidrolizar a los componentes de mayor cantidad de celulosa, hemicelulosa y menor cantidad de lignina después de los métodos de extracción para la obtención de azúcares reductores.

Estudiar la optimización de la hidrolisis ácida en función a su eficiencia e identificación de compuestos fenolicos como hidroximetil furfural (HMF) y furfural después del proceso de la hidrolisis ácida.

Estudiar los parámetros óptimos de temperatura, tiempo y concentración de ácido, durante la hidrolisis ácida para la extracción por el método de expansión por explosión en la fibra del *Agave americana*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Abramson Miron, Shoseyov Oded, Shani Ziv. (2010). Plant cell wall reconstruction toward improved lignocellulosic production and processability. *Plant Science* 178, 61–72.
2. Abril González Alejandro J. (2008). Etanol a partir de biomasa lignocelulósica. 1er taller nacional de etanol celulósico. Disponible en sitio de red:[http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/1er Taller Nacional de Etanol Celulosico pdf](http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/1er_Taller_Nacional_de_Etanol_Celulosico.pdf). Revisado el 17 de octubre del 2012.
3. Agbor Valery B, Cicek Nazim, Sparling Richard, Berlin Alex, Levin David B. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances* 29, 675–685.
4. Aguilar R, Ramirez J. A, Garrote G, Vazquez M. (2002). Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering* 55, 309 – 318.
5. Ahmad Idi, Shaza Eva Mohamad. (2011). Bioethanol from second generation feedstock (lignocellulose biomass). *Interdisciplinary Journal of Contemporary Research in Business* 3, 8.
6. Aishwarya V, Ishwarya M, Rajasekaran M, Ranjini R. (2011). Optimization of Fermentation Parameters and Purification of Cellulase with Cellulose (Paper) as Substrate. *Advanced Biotech.* 10, 40- 42.
7. Alarcón Elias Aurea victoria. (2010). Producción de bioetanol con *zymomonas mobilis*. (tesis) para obtener el grado de maestra en ciencias en bioprocesos. Instituto politécnico nacional.
8. Alcázar del Castillo Jorge. (2002). Diccionario técnico de industrias alimentarias. 2^{da} ed. Cusco. pp. 62.
9. Almenares Verdecía Juan Francisco, Ngoma Presline Frande, Serrat Díaz Manuel de Jesús. (2011). Aspectos tecnológicos generales para la conversión a etanol de la biomasa lignocelulósica II. *Tecnología Química* Vol. XXXI, No. 3.
10. Alvira P, E Tomás-Pejó, M Ballesteros, M.J Negro. (2009). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology* xxx, xxx–xxx.

11. Ankom. (2008). Neutral Detergent Fiber in Feeds Filter Bag Technique.[internet]. Ankom Technology Method. Disponible en el sitio de red: http://www.ankom.com/00_products/product_a200.shtml. Revisado el 10 de marzo del 2012.
12. Aparicio Cediél Inmaculada Mateos. (2008). Aprovechamiento de subproductos de leguminosas para la obtención de productos funcionales. Comparación de metodologías para la caracterización de la fibra alimentaria. Tesis (Dr) Universidad Complutense de Madrid Facultad de Farmacia.
13. Araque Edgardo. (2008). Obtención de bioetanol a partir de material lignocelulósico (madera). Programa de doctorado en ciencias forestales universidad de concepción. Disponible en sitio de red: <http://www.fuentesenergia.com/renacer/presentaciones/presentacion%20tesis%20panama%204.pdf>. Revisado el 2 de junio 2012.
14. Badal C. Saha. (2003). Hemicellulose bioconversion. J Ind microbiol Biotechnol 30, 279-291.
15. Badui Dergal Salvador. (1990). Química de los alimentos. 2^{da}. Ed. Alhambra Mexicana, pp. 46- 117.
16. Badui Dergal Salvador. (2006). Química de los Alimentos, Cuarta Edición. Pearson Educación: México, pp. 29 -109.
17. Balam Cocom R. J, Duarte Aranda S y Canché Escamilla G. (2006). Obtention and characterization of composites of henequen “pineapple” fibers and polypropylene. Revista Mexicana de Ingeniería Química 5, 39 - 44.
18. Balat Mustafa. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. Energy Conversion and Management. 52, 858–875.
19. Bautista justo M, García oroepza, Salcedo hernández R, Parra negrete A. (2001). Azúcares en *Agaves (Agave tequilana weber)* cultivados en el estado de guanajuato. Acta universitaria 11, 33-38.
20. Bessadok A, Langevin D, Gouanvé F, Chappey C, Roudesli S, Marais S. (2009). Study of water sorption on modified *Agave* fibres. Carbohydrate Polymers 76, 74–85.

21. Bessadok A, Marais S, Roudesli S, Lixon C, Métayer M. (2008). Influence of chemical modifications on water-sorption and mechanical properties of *Agave* fibres. *Composites: Part A*. 39, 29–45. biofuel production. *Ind. Eng. Chem* 48, 3713–3729.
22. Bledzki A.K, Gassan J. (1999). Composites reinforced with cellulose based fibres. *Prog. Polym. Sci.* 24, 221–274.
23. Cardona C.A, Quintero J.A, Paz I.C .(2010). Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology* 101, 4754–4766.
24. Cardona C.A., Quintero J.A., Paz I.C. (2009). Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology* xxx, xxx–xxx.
25. Carrera Cáceres Samantha, (2005). Ecología reproductiva de *Agave salmiana* en el estado de Puebla. Tesis (Lic.) Universidad de las Américas Puebla.
26. Cataño Elkin Hernán Rueda. (2009). Obtención y caracterización de nanofibras de celulosa a partir de desechos agroindustriales. (Tesis) para optar al título de ingeniero de químico.
27. Charles E. Wyman. (2005). *Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose*. Dartmouth College, Hanover, New Hampshire, U.S.A.
28. Cortinez Villalobos Victoria Andrea. (2010). Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: hidrólisis ácida y líquidos iónicos. (tesis). Para optar al grado de magíster en ciencias de la ingeniería mención química y memoria para optar al título de ingeniero civil químico. Universidad de Chile.
29. Crespo Melgar Carla Fabiana. (2009). Selección, aislamiento e identificación de microorganismos anaerobios termófilos productores de etanol. (Tesis) para optar al grado de Magister ciencias.
30. Cuervo Laura, Folch Jorge Luis, Quiroz Rosa Estela. (2009). Lignocelulosa Como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Bio Tecnología* 13, 3.
31. Dieter beliz Hans. (1985). *Química de los Alimentos*. Acribia S.A. Zaragoza España. pp. 264 -265.

32. Duff Sheldon j. B y Murrayh william D. (1996). Bioconversion of forest products industry Wastecellulosicstofueethanol: Areview. Bioresource technology. 55, 1-33.
33. Dushyant Kothari Urvi. (2012). Ethanol from lignocellulosic biomass: deacetylation, pretreatment, and enzymatic hydrolysis. (Tesis) doctoral.
34. Dutta Rajiv. (2008). Fundamentals of Biochemical Engineering. ISBN 978-3-540-779fYJ-1 Springer Berlin Heidelberg New York.
35. Escamilla Treviño Luis Lauro. (2011). Potential of plants from the genus *Agave* as Bioenergy Crops. Bioenerg. Res. Springerlink.com.
36. Espitia Sibaja Héctor Mauricio. (2010). Aislamiento de nanofibras de celulosa a partir de residuos agroindustriales de fique y caña de azúcar, con potencial aplicación en reforzamiento de polímeros termoplásticos. (Tesis) requisito para optar al título de Magíster en ciencia química.
37. Farone William A, Cuzens John E. (1998). Method of producing sugars using strong acid hydrolysis. Unites patent. Number 5726046.
38. Fitz Patrick Michael, Champagne Pascale, Cunningham Michael F, Whitney Ralph A. (2010). A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. Bioresource Technology 101, 8915–8922.
39. Flores Ríos Paulina Alejandra. (2009). Compostaje de dos materiales de bagazo de maguey tequilero (*Agave tequilana Weber*) y su determinación física y fisicoquímica. (Tesis) para obtener el grado académico de maestro en ciencias.
40. Galbe M, Zacchi G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood, Appl Microbiol Biotechnol 59,618–628.
41. García Cruz Ariel, Martín Medina Carlos. (2006). Residuos de cítrico un sustrato promisorio para su bioconversión en Etanol. Disponible en sitio de red:<http://monografias.umcc.cu/monos/2006/qui-mec/residuos%20de%20citrico%20un.pdf>. Revisado 19 de setiembre de 2012.
42. Ghose T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. Pure & Applied Chemistry 59, 257-268.

43. Gírio F.M, Fonseca C, Carvalheiro F, Duarte L.C, Marques S, Bogel-Lukasik R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology* 101, 4775–4800.
44. Gómez Francisco Tovar. (2008). Métodos secuenciales de pretratamiento químico y enzimático de residuos agrícolas para la producción de metano. (Tesis) Para obtener el grado de maestro en ciencias aplicadas.
45. Guarnizo Franco, Anderson; Martínez Yépes, Pedro Nel; Valencia Sánchez, Hoover Albeiro. (2009). Pretratamientos de la celulosa y biomasa para la sacarificación. *Scientia et technica* XV, 42.
46. Guillot Ortiz Daniel, Van der Meer Piet, Laguna Lumbreras Emilio, Rosselló Picornell Josep Antoni. (2008). El género *Agave L.* en la flora alóctona valenciana. Monografía disponible en sitio de red: www.floramontiberica.org. Revisado el 15 de febrero del 2010.
47. Gumeta Chávez Carolina. (2009). Estudio del secado convectivo y de la extracción de celulosa a través del proceso organosolv a partir de *Agave atrovirens* karw. (Tesis) para obtener el grado de doctor en ciencias en alimentos. Instituto politécnico nacional escuela nacional de ciencias biológicas.
48. Hamissa Aicha Menyar Ben, Lodi Alessandra, Seffen Mongi, Finocchio Elisabetta, Botter Rodolfo, Converti Attilio. (2010). Sorption of Cd(II) and Pb(II) from aqueous solutions onto *Agave Americana* fibers. *Chemical Engineering Journal*. 159, 67–74.
49. Harmsen P.F.H, Huijgen. W.J.J, Bermudez lópez.L.M, Bakker .R.R.C, (2010). Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. *Food of biobased research*.
50. Hendriks A.T.W.M., Zeeman G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100, 10–18.
51. Hernández Salas J.M, Villa Ramírez M.S, Veloz Rendón J.S, Rivera Hernández K.N, González-César R.A, Plascencia Espinosa M.A, Trejo Estrada S.R. (2009). Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and *Agave* bagasse. *Bioresource Technology* 100, 1238–1245.

52. Huang Hua-Jiang, Ramaswamy Shri, Tschirner U.W, Ramarao B.V. (2008). A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Separation and Purification Technology* 62, 1–21.
53. Hui Zhou – Chun, Xi Xia, Xiang Lin – Chun, Shen Tong – Dong y Beltramini Jorge. (2011). Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels. Cite this: *Chem. Soc. Rev.* 40, 5588–5617.
54. Íñiguez Gilberto, Acosta Nalleli, Martínez Liliana, Parra Javie, González Orfil. (2005). Utilización de subproductos de la industria tequilera parte 7 Compostaje de bagazo de *Agave* y vinazas tequileras. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 21, 37 – 50.
55. Íñiguez Gilberto, Martínez Gabino, Flores paulina, Gil Virgen. (2011). Utilización de subproductos de la industria tequilera parte 9. Monitoreo de la evolución del compostaje de dos fuentes distintas de bagazo de *Agave* para la obtención de un substrato para jitomate. *Rev. Int. Contam. Ambie* 27, 47-59.
56. Janga Kando K., Hagg May Britt, Moe Storker T. (2012). Influence of acid concentration, temperature, and time on decrystallization in two-stage concentrated sulfuric acid hydrolysis of pinewood and spenwood: a statistical approach. *Bio resources*7, 391-411.
57. Jurado López Sofía Evelyn, Sarzosa Pazmiño Xavier Santiago. (2009). Estudio de la cadena agroindustrial de la cabuya en la producción de miel y licor de cabuya. Proyecto previo a la obtención del título de ingenieros Agroindustriales. Disponible en sitio de red: <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/1693/1/cd-2305.pdf>. Revisado el 19 de octubre 2012.
58. Kumar Parveen, Barrett Diane M, Delwiche Michael J, Stroeve Pieter. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and.
59. Laopaiboon Pattana, Thani Arthit, Leelavatcharamas Vichean, Laopaiboon Lakkana. (2010). Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. *Bioresource technology* 101, 1036–1043.

60. Leenakul W, Tippayawong N. (2010). Dilute acid pretreatment of bamboo for fermentable sugar production. *Journal of sustainable energy & environment* 1, 117-120.
61. Maya Jacob John, Sabu Thomas. (2008). Biofibres and biocomposites. *Carbohydrate Polymers* 71, 343–364.
62. Mejía Giraldo L. F., Martínez Correa H. A., Betancourt Gutiérrez J. E y Castrillón Castaño C. E. (2007). Aprovechamiento del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica L.*) en la obtención de azúcares fermentables. *Ingeniería y Ciencia* 3, 41 – 62.
63. Miller Gail Lorenz. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*. 31, 426 – 428.
64. Monsalve G John F, Medina de Pérez Victoria Isabel, Ruiz Colorado Angela Adriana. (2006). Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y de almidón de yuca. *Dyn* 150, 21-27.
65. Mosier Nathan, Wyman Charles, Dale Bruce, Elander Richard, Lee Y.Y, Holtzapple Mark, Ladisch Michael. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96, 673–686.
66. Mysamy K, Rajendran I. (2011). The mechanical properties, deformation and thermo mechanical properties of alkali treated and untreated *Agave* continuous fiber reinforced epoxy composites. *Materials and Design* 32, 3076–3084.
67. Niklitschek Contente Tomas Andres. (2010). Selección de condiciones de fermentación de residuos de lenge para la producción de bioetanol. (Tesis) para optar el título de ingeniero civil en biotecnología.
68. Ochoa Botero Juan Carlos. (2009). Uso del licor de plantas *agavaceas* como aditivo en morteros y hormigones. Tesis (Dr). Universidad Politécnica de Valencia.
69. Ojeda Delgado Karina Angélica. (2011). Aplicación de análisis exergético para la evaluación de procesos de producción de bioetanol de segunda generación. Tesis doctoral presentada como requisito parcial para optar por el título de Doctor en Ingeniería Química.

70. Parsons Martínez Carolina, Ramith Banqueth Emmanuel. (2004). Diseño de una planta piloto para la producción de etanol a partir el bagazo de la caña de azúcar. (Tesis) para optar el título de ingeniero químico.
71. Percival Zhang Y-H, Himmel Michael E, Mielenz Jonathan R. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* 24, 452–48.
72. Perego Carlo, Bianchi Daniele. (2010). Biomass upgrading through acid–base catalysis. *Chemical Engineering Journal* 161, 314–322.
73. Quevedo Hidalgo Balkys Esmeralda. (2011). Evaluación de la degradación de residuos de floricultura para la obtención de azúcares con el uso de tres hongos lignocelulolíticos. (Tesis) presentada como requisito parcial para optar al título de: Doctor en ingeniería química.
74. Ren Nanqi, Wang Aijie, Cao Guangli, Xu Jifei, Gao Lingfang. (2009). Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges. *Biotechnology Advances* 27, 1051–1060.
75. Ricks MAJ Matthew R, Vogel Paula S, Elston Dirk M, Hivnor Chad. (1999). Purpuric *Agave* dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 40, 2 – 2.
76. Rios Manriquez Neida. (2008). Aislamiento de cepas anaerobias termófilas productoras de celulasas y hemicelulasas, provenientes de la región altiplánica de bolivia, implicadas en la producción de etanol mediante técnicas de cultivo y aislamiento tradicionales y no tradicionales. Instituto de investigaciones fármaco bioquímicas biotecnología microbiana. Disponible en sitio de red: <http://bibliotecadigital.umsa.bo:8080/rddu/bitstream/123456789/637/1/TN1033.pdf>. Revisado el 15 julio del 2013.
77. Rojas Domingo Edwin Aroldo. (2004). Evaluación de paja de trigo, *Triticum sativum*; broza de encino, *Quercus sp.* y rastrojo de maiz, *Zea mays*; para el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* bajo condiciones artesanales en san rafael la independendencia, huehuetenango. (Tesis) para optar el grado de ingeniero agrónomo.
78. Romero I, Ruiz E., Castro E., Moya M. (2010). Acid hydrolysis of olive tree biomass. *Chemical Engineering Research and Design* 88, 633–640.

79. Sánchez Carmen. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27, 185–194.
80. Sánchez Carrasco Iván Napoleón. (2007). Producción de hidrógeno a partir de residuos agrícolas por vía fermentativa. (Tesis) para optar el grado de maestro en ciencias aplicadas.
81. Sánchez Gladys, Pilcher Linda, Roslander Christian, Modig Tobias, Galbe Mats, Liden Gunnar. (2004). Dilute-acid hydrolysis for fermentation of the Bolivian straw material Paja Brava. *Bioresource Technology* 93, 249–256.
82. Sarah C. Davis, Frank G. Dohleman, Stephen P. Long. (2011). The global potential for *Agave* as a biofuel feedstock. *Global Change Biology Bioenergy* 3, 68–78.
83. Saucedo Luna J, Castro-Montoya AJ, Rico JL, Campos García J. (2010). Optimization of acid hydrolysis of bagasse from *Agave tequilana* Weber. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 9, 91-97.
84. Saval Susana. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. *BioTecnología*. Vol. 16 No. 2
85. Saxena R.C, Adhikari D.K, Goyal H.B. (2009). Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13, 167–178.
86. Schacht Christian, Carsten Zetzl, Gerd Brunner. (2008). From plant materials to ethanol by means of supercritical fluid technology. *J. of Supercritical Fluids* 46, 299–321.
87. Shanti Faridah Salleh, Robiah Yunus, Mohd Farid Atan, Dyg Radiah Awg Biak. (2012). kinetic studies on acid hydrolysis of OPEFB in a batch reactor. *IPCBE* vol. 38. Press, Singapore.
88. Soccol Carlos Ricardo, Vandenberghe Luciana Porto de Souza, Bianchi Pedroni Medeiros Adriane, Karp Susan Grace, Buckeridge Marcos, Pereira Ramos Luiz, Pitarelo Ana Paula, Ferreira-Leitão Viridiana, Fortes Gottschalk Leda Maria, Ferrara Maria Antonieta, Pinto da Silva Bon Elba, Pepe de Moraes Lidia Maria, Amorim Araújo Juliana, Araripe GonCalves Torres Fernando. (2009). Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*. Xxx, xxx–xxx.

89. Solís Pacheco Josué R, Francisco Pérez Martínez, Ignacio Orozco Ávila, José Luis Flores Montaña, Ernesto Ramírez Romo, Angelina Hernández Rosales, Blanca Aguilar Uscanga. (2006). Descripción de un proceso tecnificado para la elaboración de piloncillo a partir de caña de azúcar. Vol.4, Art.1.
90. Somesh Ajnavi. (2008). Bioconversion of Cellulosic agricultural wastes. Thapar University. Department of Biotechnology and Environmental Sciences. Disponible en sitio de red: <http://dspace.thapar.edu:8080/dspace/bitstream/10266/663/3/T663.pdf>.
Revisado el 20 Julio del 2012.
91. Sukumaran Rajeev K, Surender Vikram Joshua, Sindhu Raveendran, Binod Parameshwaran, Janu Kanakambaran Usha, Sajna Kuttavan Valappil, Rajasree Kuni Parambil, Pandey Ashok. (2009). Lignocellulosic ethanol in India: Prospects, challenges and feedstock availability. *Bioresource Technology*. Xxx, xxx-xxx.
92. Talebnia Farid, Karakashev Dimitar, Angelidaki Irini. (2009). Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology* xxx, xxx-xxx.
93. Thamae Timothy, Marien Ryan, Chong Lisa, Wu Christina, Baillie Caroline. (2008). Developing and characterizing new materials based on wasteplastic and agro-fibre. *J Mater Sci* 43, 4057-4068.
94. Tomás Pejó Elia. (2010). Bioetanol de paja de trigo: estrategias de integración de las etapas del proceso. (Tesis) doctoral.
95. Triana Caranton Cristian Fernando. (2010). Producción de etanol a partir de residuos provenientes del cultivo de café. (tesis) de posgrado.
96. Usnayo Gonzales Pamela Laura. (2007). Optimización de medios de cultivo, para la producción de enzimas ligninolíticas, por cepas fungicas aisladas del altiplano boliviano. (Tesis) para optar el titulo de licenciatura en bioquímica.
97. Valiño, Elaine; García, R.; Albelo, Nereida. (2004). Efecto de la inoculación de la cepa de *Trichoderma viride* 137 MCXI en mezclas de *Vigna unguiculata* y bagazo de caña de azúcar para disminuir factores antinutricionales. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 38, 65-72.

98. Vilcanqui Pérez Fulgencio. (2009). Extracción y Caracterización Funcional de la Fibra de hojas del *Agave tequilana* weber destinados para la inclusión en alimentos. (Tesis) Maestro en ciencias con Acentuación en Alimentos. Universidad Autónoma de Nuevo León.
99. Wyman Charles E. (1994). Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. *Bioresource Technology* 50, 3-16.
100. Xuebing Zhao, Lihua Zhang, Dehua Liu. (2008). Comparative study on chemical pretreatment methods for improving enzymatic digestibility of crofton weed stem. *Bioresource Technology* 99, 3729–3736.
101. Ye Sun, Cheng Jay J. (2005). Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource Technology* 96, 1599–1606.
102. Ye Sun, Cheng Jiayang. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83, 1–11.
103. Zheng Yi, Pan Zhongli, Zhang Ruihong. (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol Production. *Int J Agric & Biol Eng.* 2, 51–68.

ANEXOS

Anexo 01: Determinación de humedad (Método gravimétrico)

Método aplicado (NTP 209.264 – 2001)

Aplicación

El método es aplicable en alimentos cocidos de reconstitución instantánea las mismas que son consumidas de forma directa, cuya composición puede tener mezclas de cereales, granos andinos, tubérculos entre otros.

Principio de método

El método está basado en la deshidratación de la muestra, por calentamiento en estufa a 100 ± 102 °C.

Equipos, materiales

Balanza analítica, con resolución de 0.1 mg.

Estufa con regulador de temperatura a 100 ± 2 °C.

Placa de base plana de diámetro ≥ 5 cm, con tapa.

Desecador de vidrio con agente desecante.

Espátula.

Pinzas metálicas.

Preparación de muestra

Homogenizar la muestra, en una bolsa de plástico, cuya capacidad sea el doble de la cantidad de muestra a analizar.

Procedimiento

Precalentar la estufa a 100 ± 2 °C.

Secar la placa durante 1 hora y enfriar en desecador y pesar.

Colocar en la placa de 2.5 a 3 g de muestra preparada.

Secar por 3 h en estufa a 100 ± 2 °C.

Enfriar en desecador, pesar rápidamente.

Cálculo y expresión de resultados

Reportar la pérdida de peso como humedad

$$\%H = \frac{((P_1 + M_1) - (P_1 + M_2))}{M_1} \times 100$$

Dónde:

P₁= peso de la placa (g).

M₁ =peso de la muestra (g).

M₂= peso de la muestra seca (g).

Anexo 02: Método de fibra detergente neutra (FDN)

Método aplicado (Ankom, 2008)

Aplicación

Este método es aplicable a granos, comida, forrajes y toda materia prima que sea susceptible a la solución detergente neutra.

Materiales, equipos, reactivos y utensilios

Materiales

- Agitador vortex.
- Bolsas de filtración de Ankom K – F 57.
- Desecador.
- Envase de vidrio 5 L.
- Marcador resiste a solventes.
- Pipeta 5ml.
- Probeta 50 ml.
- Vaso precipitado 1L.

Equipos

- Balanza analítica.
- Estufa.
- Sellador a calor.

Reactivos

- Acetona.
- Ácido clorhídrico.
- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA).
- Agua destilada.
- Etileno glicol éter monoetílico.
- Fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4).
- Hidróxido de sodio (NaOH).
- Sulfato lauril sódico.
- Sulfito de sodio.
- Tetraborato de sodio decahidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$).

Preparación de solución de fibra detergente neutra (FDN)

Para preparar la solución de FDN; en base a un litro de agua destilada se muestra en la tabla 01, el hidróxido de sodio es disuelto en 150 ml de agua destilada para luego agregar el EDTA y el $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ hidratado. Paralelamente en otro vaso, se disuelve calentando el fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4) en 20 ml de agua destilada. Estas dos soluciones son mezcladas mientras estén calientes. Por otro lado, el sulfato lauril sódico es disuelto alrededor de 200 ml de agua destilada, para luego agregar a un frasco por medio de un embudo que este llegue al fondo. Finalmente se completa esta primera etapa con la adición de 10 ml etilen glicol éter monoetílico para evitar la espuma, luego enrasar con agua hasta un litro. Al día siguiente, se mide el pH, el que debe estar entre 6.9 y 7.1, de lo contrario se debe ajustar con NaOH o HCl 5 N (Ankom, 2008).

Tabla 01. Reactivos para solución neutro detergente

Reactivos		Cantidad
Nombre común	Nombre comercial	
Agua destilada	Agua destilada	1 litro
Sulfato lauril sódico	Sodio dodecilsulfato (C ₁₂ H ₂₅ OSO ₂ ONa)	30 gramos
Ácido etilendiaminotetracético (EDTA)	Ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ * 2 H ₂ O) (EDTA)	14.61 gramos
Hidróxido de sodio (NaOH)	Hidróxido de sodio (NaOH)	4 gramos
Tetraborato de sodio decahidratado (Na ₂ B ₄ O ₇ *10H ₂ O)	Di-Sodio tetraborato decahidrato (Na ₂ B ₄ O ₇ *10 H ₂ O)	6.81 gramos
Fosfato disódico anhidro (Na ₂ HPO ₄)	Di-Sodio hidrogenofosfato (Na ₂ HPO ₄)	4.56 gramos
Etileno glicol éter monoetilico	Trietilenglicol (HO(CH ₂ CH ₂ O) ₃ H)	10 mililitros

Fuente: (Vilcanqui, 2009) y Elaboración propia.

Procedimiento de la fibra detergente neutro (FDN)

Para proceder con la determinación de FDN, las muestras de fibra deben estar completamente deshidratadas y reducidas de tamaño en un molino, con una malla de 0.5 mm. Las bolsas de filtración K- F 57-ANKOM, son codificadas mediante el uso de un marcador resistente a solventes, luego pesadas en la balanza analítica, registrando el peso como (W₁). Pesar 0.45 a 0.55 gramos de muestra dentro de la bolsa de filtración registrándose como W₂ (peso de la muestra). Las bolsas son selladas térmicamente en la parte superior a una distancia de 4 mm. Paralelamente por cada lote experimental, es incluida una bolsa de filtración vacía como blanco registrándose con el peso (C₁). Las bolsas fueron colocadas en tres vasos precipitados de un litro, las que se encontraban con 8 unidades cada una, a las que se les añadió 400 ml de solución neutro detergente y 4 g de sulfito de sodio; para luego proceder la digestión a una temperatura de 97 ± 2°C (ebullición), por un tiempo de 75 minutos. Terminada esta operación se lava hasta por tres veces con agua destilada a una

temperatura de 70 a 90°C. Llevar a la estufa a $102 \pm 2^\circ\text{C}$ por un tiempo de 4 horas, transcurrido este tiempo, pesar y registrar como (W_3).

Nota: Si la muestra contiene mayores a 5% de grasa, esta debe ser extraída con acetona; usar un mínimo de 1500 ml de solución por 24 muestras por corrida luego agregar 20 g o (0.5 g /50 ml) de sulfito de sodio.

La ecuación que permite estimar el porcentaje de FDN es:

$$\% \text{FDN} = \frac{(W_3 - (W_1 C_1))}{W_2} \times 100$$

Dónde:

W_1 : Es el peso de la bolsa de filtro

W_2 : Es el peso de la muestra.

W_3 : Es el peso seco de la bolsa con fibra, después del proceso de digestión.

C_1 : Es la relación del peso final y la inicial de la bolsa de filtración.

Anexo 02.1: Resultados de FDN por el método hidrotérmico

Tabla 02. Resultados de FDN en el método hidrotérmico.

Combinaciones			W ₁	W ₂	W ₃	C ₁	
Temperatura (°C)	Tiempo (g)	Relación (F:H ₂ O)	P inicial bolsa (g)	P muestra (g)	P final bolsa + muestra (g)	P corrección	FDN (%)
90	15	1:2	0,3997	0,5030	0,7409	1,0043	67,4913
90	15	1:2	0,3762	0,5037	0,7365	1,0043	71,2095
90	15	1:2	0,4488	0,5011	0,8262	1,0043	74,9292
90	15	1:1	0,4400	0,5037	0,7979	1,0043	70,6786
90	15	1:1	0,4409	0,5006	0,7983	1,0043	71,0156
90	15	1:1	0,4356	0,5057	0,7947	1,0043	70,6401
90	10	1:2	0,4720	0,5035	0,8151	1,0043	67,7399
90	10	1:2	0,4648	0,5025	0,8094	1,0043	68,1794
90	10	1:2	0,4082	0,5035	0,7502	1,0043	67,5759
90	10	1:1	0,4332	0,5040	0,7705	1,0043	66,5550
90	10	1:1	0,4613	0,5042	0,7920	1,0043	65,1956
90	10	1:1	0,4142	0,5060	0,7558	1,0043	67,1579
80	15	1:2	0,5290	0,5013	0,7971	1,0043	53,0272
80	15	1:2	0,5300	0,5078	0,8157	1,0043	55,8135
80	15	1:2	0,5245	0,5004	0,8014	1,0043	54,8850
80	15	1:1	0,5340	0,5010	0,8375	1,0043	60,1205
80	15	1:1	0,5241	0,5013	0,8123	1,0043	57,0410
80	15	1:1	0,4787	0,5048	0,7776	1,0043	58,8038
80	10	1:2	0,5528	0,5011	0,8201	1,0043	52,8683
80	10	1:2	0,5294	0,5045	0,8002	1,0043	53,2257
80	10	1:2	0,5297	0,5089	0,8001	1,0043	52,6866
80	10	1:1	0,5286	0,5050	0,7786	1,0043	49,0549
80	10	1:1	0,5383	0,5044	0,7916	1,0043	49,7592
80	10	1:1	0,5390	0,5029	0,7899	1,0043	49,4298

*P: peso, F: fibra

Tabla 03. Peso de la bolsa de filtración Ankom K - F 57 en blanco.

Peso de bolsa blanco FDN		
P inicial (g)	P final (g)	P corrección (C ₁)
0,5352	0,5375	1,0043

Anexo 02.1.1: ANOVA factorial – fibra detergente neutra (FDN) para el método hidrotérmico

Variable dependiente: FDN

Factores: Temperatura.

Tiempo.

Relación fibra de *Agave* /agua (F: H₂O).

Número de casos completos: 24

Tabla 04. ANOVA factorial de FDN en el método hidrotérmico

FDN					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1557,331	7	222,476	90,896	0,000
Intra-grupos	39,161	16	2,448		
Total	1596,493	23			

Tabla 05. Pruebas de los efectos inter-sujetos en función a la FDN en el método hidrotérmico.

Variable dependiente: FDN

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1557,331 ^a	7	222,476	90,896	0,000
Intersección	90662,006	1	90662,006	37041,340	0,000
Temp	1374,891	1	1374,891	561,732	0,000
Tiem	131,728	1	131,728	53,820	0,000
Rel	,728	1	0,728	0,297	0,593
Temp * Tiem	3,455	1	3,455	1,412	0,252
Temp * Rel	2,397	1	2,397	0,979	0,337
Tiem * Rel	28,312	1	28,312	11,567	0,004
Temp * Tiem * Rel	15,820	1	15,820	6,464	0,022
Error	39,161	16	2,448		
Total	92258,499	24			
Total corregida	1596,493	23			

a. R cuadrado = ,975 (R cuadrado corregida = ,965)

Donde: Temp: temperatura, Tiem: tiempo, Rel: relación

Tabla 06. Comparación de medias en el método hidrotérmico en función a las variables de FDN.

HSD de Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
8,00	3	49,4149				
7,00	3	52,9272	52,9272			
5,00	3		54,5755	54,5755		
6,00	3			58,6553		
4,00	3				66,3031	
3,00	3				67,8319	67,8319
2,00	3					70,7783
1,00	3					71,2102
Sig.		0,177	0,890	0,082	0,921	0,210

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Anexo 02.2: Resultados de FDN por el método de expansión por explosión

Tabla 07. Resultados de FDN en el método expansión por explosión.

Combinaciones			W ₁	W ₂	W ₃	C ₁	
Presión (psi)	P Fibra (g)	Humedad (%)	P inicial bolsa (g)	P muestra (g)	P final bolsa + muestra (g)	P corrección	FDN (%)
110,0000	110,0000	62,0000	0,5211	0,5039	0,8055	1,0043	55,9951
110,0000	110,0000	62,0000	0,5166	0,5028	0,7991	1,0043	55,7436
110,0000	110,0000	62,0000	0,5303	0,5040	0,8075	1,0043	54,5476
110,0000	110,0000	53,0000	0,5288	0,5024	0,8079	1,0043	55,1007
110,0000	110,0000	53,0000	0,5108	0,5042	0,7886	1,0043	54,6616
110,0000	110,0000	53,0000	0,5331	0,5036	0,8111	1,0043	54,7474
110,0000	90,0000	62,0000	0,5039	0,5037	0,7882	1,0043	56,0122
110,0000	90,0000	62,0000	0,5322	0,5060	0,8179	1,0043	56,0102
110,0000	90,0000	62,0000	0,4869	0,5006	0,7735	1,0043	56,8331
110,0000	90,0000	53,0000	0,5007	0,5007	0,7982	1,0043	58,9868
110,0000	90,0000	53,0000	0,4709	0,5021	0,7682	1,0043	58,8080
110,0000	90,0000	53,0000	0,4957	0,5009	0,7885	1,0043	58,0292
130,0000	110,0000	62,0000	0,4994	0,5024	0,7884	1,0043	57,0965
130,0000	110,0000	62,0000	0,5047	0,5029	0,7901	1,0043	56,3193
130,0000	110,0000	62,0000	0,4849	0,5073	0,7735	1,0043	56,4784
130,0000	110,0000	53,0000	0,4876	0,5007	0,7560	1,0043	53,1862
130,0000	110,0000	53,0000	0,5047	0,5020	0,7738	1,0043	53,1733
130,0000	110,0000	53,0000	0,5024	0,5035	0,7729	1,0043	53,2949
130,0000	90,0000	62,0000	0,4933	0,5006	0,7714	1,0043	55,1296
130,0000	90,0000	62,0000	0,4987	0,5043	0,7794	1,0043	55,2361
130,0000	90,0000	62,0000	0,4968	0,5021	0,7760	1,0043	55,1810
130,0000	90,0000	53,0000	0,4938	0,5054	0,7691	1,0043	54,0516
130,0000	90,0000	53,0000	0,4956	0,5040	0,7728	1,0043	54,5772
130,0000	90,0000	53,0000	0,4921	0,5017	0,7735	1,0043	55,6675

*P: peso

Tabla 08. Peso de la bolsa de filtración Ankom K - F 57 en blanco.

Peso de bolsa blanco FDN		
P inicial (g)	P final (g)	P corrección (C ₁)
0,5352	0,5375	1,0043

Anexo 02.2.1: ANOVA factorial – fibra detergente neutra (FDN) para el método de expansión por explosión

Variable dependiente: FDN

Factores: Presión.
Peso de la fibra.
Humedad.

Número de casos completos: 24

Tabla 09. ANOVA factorial de FDN en el método de expansión por explosión.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	53,205	7	7,601	30,524	0,000
Intra-grupos	3,984	16	0,249		
Total	57,190	23			

Tabla 10. Prueba de los efectos inter- sujetos en función a la variable de FDN en método de expansión por explosión.

Variable dependiente: FDN

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	53,205 ^a	7	7,601	30,524	0,000
Intersección	74245,236	1	74245,236	298163,016	0,000
Pres	10,779	1	10,779	43,288	0,000
Pes	8,376	1	8,376	33,636	0,000
Hum	1,653	1	1,653	6,637	0,020
Pres * Pes	7,695	1	7,695	30,901	0,000
Pres* Hume	11,596	1	11,596	46,568	0,000
Pes* Hum	13,105	1	13,105	52,629	0,000
Pres * Pes * Hum	,002	1	0,002	0,010	0,922
Error	3,984	16	0,249		
Total	74302,425	24			
Total corregida	57,190	23			

a. R cuadrado = ,930 (R cuadrado corregida = ,900)

Dónde: Pres: presión, Pes: peso, Hum: humedad

Tabla 11. Comparación de medias en el método de expansión por explosión en función a la variable de FDN.

HSD de Tukey*

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
6,00	3	53,2184				
8,00	3		54,7657			
2,00	3		54,8368			
7,00	3		55,1825	55,1825		
1,00	3		55,4290	55,4290	55,4290	
3,00	3			56,2854	56,2854	
5,00	3				56,6316	
4,00	3					58,6083
Sig.		1,000	0,729	0,190	0,126	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Anexo 03: Método de fibra detergente ácida (FDA):

Método aplicado (Ankom, 2008)

Aplicación

Este método es aplicable a granos, comida, forrajes y toda materia prima que sea resistente a la solución ácida.

Materiales, equipos, reactivos.

Materiales

- Vaso precipitado 1 L.
- Agitador vortex.
- Probeta 50 ml.
- Envase de vidrio 5 L.

- Pipeta 5 ml.
- Marcador resiste a solventes.
- Desecador.
- Bolsas de filtración de Ankom K – F 57.

Equipos

- Balanza analítica.
- Estufa.
- Sellador a calor.

Reactivos

- Acetona.
- Ácido sulfúrico 1.00N H₂SO₄.
- Agua destilada.
- Cetyl trimetil amonio bromuro (CTAB).

Preparación de la solución detergente ácido (FDA)

La solución ácida detergente se añade 20g cetyl trimetil amonio bromuro (CTAB) a 1 litro de 1.00 N H₂SO₄ estandarizó (solución químico disponible de Ankom) agitar la solución.

Procedimiento de la fibra detergente ácido (FDA)

Para la cuantificación de FDA las muestras fueron molidas a tamaños de 0.5 mm en un molino de disco; seguidamente las bolsas de filtro K - F 57 - ANKOM son pesadas (W₁); luego las muestras fueron pesadas directamente en las bolsas de filtro aproximadamente en un margen de 0.45 - 0.55 g siendo este el peso (W₂), las que fueron sellas herméticamente con un sellador térmico durante dos segundos, también se pesa una bolsa en blanco (C₁) para su corrección, una vez terminada las operaciones mencionadas, 8 muestras selladas se introdujeron a un vaso precipitado el cual contiene una solución ácido detergente de 800 ml, las que se operaron por un tiempo de 60 minutos a una temperatura de ebullición de 97 ± 2 °C, una vez terminada el proceso las bolsas fueron lavadas con agua caliente a 70 - 90 °C hasta un pH neutro, las que se presionaron suavemente y removieron el exceso de agua,

para luego ser secadas en la estufa a 102 ± 2 °C durante 4 horas para luego ser pesadas una vez que estén frías (W_3).

Nota:

- Si se procesa muestras menores a 20, se debe usar 100 ml/bolsa de solución de ácido detergente. Usar un mínimo de 1500 ml de solución.
- Si la muestra contiene mayores a 5% de grasa, esta debe ser extraída con acetona esta debe de ser cubierta con suficiente acetona; las bolsas deben estas cubiertas durante 10 minutos.

$$\%FDA = \frac{(W_3 - (W_1 C_1))}{W_2} \times 100$$

Dónde:

W_1 : Es el peso de bolsa de filtro.

W_2 : Es el peso de la muestra.

W_3 : Es el peso de la bolsa y la muestra seca después de la digestión.

C_1 : Es la relación del peso final y la inicial de la bolsa de filtración.

Anexo 03.1: Resultados de FDA por el método hidrotérmico

Tabla 12. Resultados de FDA en el método hidrotérmico.

Combinaciones			W ₁	W ₂	W ₃	C ₁	
Tempo (°C)	Temperatura (g)	Relación (F:H ₂ O)	P inicial bolsa (g)	P muestra (g)	P final (g)	P corrección	FDA (%)
90	15	1:2	0,4489	0,5019	0,7004	0,9977	50,3178
90	15	1:2	0,4635	0,5024	0,7051	0,9977	48,3040
90	15	1:2	0,4505	0,5041	0,7111	0,9977	51,9041
90	15	1:1	0,4721	0,5042	0,7419	0,9977	53,7285
90	15	1:1	0,4379	0,5019	0,6930	0,9977	51,0300
90	15	1:1	0,4663	0,5032	0,7278	0,9977	52,1831
90	10	1:2	0,4477	0,5036	0,7080	0,9977	51,8948
90	10	1:2	0,4558	0,5027	0,7238	0,9977	53,5232
90	10	1:2	0,5385	0,5027	0,7987	0,9977	52,0099
90	10	1:1	0,4594	0,5014	0,7009	0,9977	
90	10	1:1	0,4639	0,5035	0,7121	0,9977	
90	10	1:1	0,4827	0,5009	0,7398	0,9977	
80	15	1:2	0,4731	0,5006	0,7370	0,9977	52,9368
80	15	1:2	0,4728	0,5030	0,7469	0,9977	54,7119
80	15	1:2	0,4553	0,5021	0,7244	0,9977	53,8060
80	15	1:1	0,4548	0,5003	0,7063	0,9977	50,4815
80	15	1:1	0,4615	0,5026	0,7241	0,9977	52,4621
80	15	1:1	0,4951	0,5008	0,7513	0,9977	51,3883
80	10	1:2	0,4534	0,5047	0,7085	0,9977	50,7540
80	10	1:2	0,4453	0,5022	0,6925	0,9977	49,4298
80	10	1:2	0,4323	0,5043	0,6813	0,9977	49,5749
80	10	1:1	0,4568	0,5030	0,6989	0,9977	48,3426
80	10	1:1	0,4608	0,5042	0,7062	0,9977	48,8839
80	10	1:1	0,4761	0,5016	0,7193	0,9977	48,7058

*P: peso:

Tabla 13. Peso de la bolsa de filtración Ankom K - F 57 en blanco

Peso de bolsa blanco FDA		
P inicial (g)	P final (g)	P corrección (C ₁)
0,4725	0,4714	0,9977

Anexo 03.1.1: ANOVA factorial – Fibra detergente ácida (FDA) para el método hidrotérmico

Variable dependiente: FDA

Factores: Temperatura.

Tiempo.

Relación fibra de *Agave* /agua (F: H₂O).

Número de casos completos: 24

Tabla 14. ANOVA factorial de FDA en método hidrotérmico.

FDA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	62,414	7	8,916	6,558	0,001
Intra-grupos	21,752	16	1,360		
Total	84,166	23			

Tabla 15. Pruebas de los efectos inter-sujetos en función a la variable de FDA en el método hidrotérmico.

Variable dependiente: FDA

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	62,414 ^a	7	8,916	6,558	0,001
Intersección	62609,043	1	62609,043	46052,206	0,000
Temp	,340	1	,340	0,250	0,624
Tiem	17,846	1	17,846	13,127	0,002
Rel	6,533	1	6,533	4,805	0,044
Temp * Tiem	15,837	1	15,837	11,649	0,004
Temp * Rel	3,664	1	3,664	2,695	0,120
Tiem * Rel	5,141	1	5,141	3,781	0,070
Temp * Tiem * Rel	13,054	1	13,054	9,602	0,007
Error	21,752	16	1,360		
Total	62693,209	24			
Total corregida	84,166	23			

a. R cuadrado = ,742 (R cuadrado corregida = ,628)

Donde: Temp: temperatura, Tiem: tiempo, Rel: relación

Tabla 16. Comparación de medias en el método hidrotérmico en función a la variable de FDA.

HSD de Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
8,00	3	48,6441		
4,00	3	49,8133	49,8133	
7,00	3	49,9196	49,9196	
1,00	3	50,1753	50,1753	
6,00	3	51,4440	51,4440	51,4440
2,00	3		52,3139	52,3139
3,00	3		52,4760	52,4760
5,00	3			53,8182
Sig.		0,128	0,164	0,265

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Anexo 03.2.: Resultados de FDA por el método de expansión por explosión

Tabla 17. Resultados de FDA en el método de expansión por explosión.

Combinaciones			W ₁	W ₂	W ₃	C ₁	
Presión (psi)	P Fibra (g)	Humedad (%)	P inicial bolsa (g)	P muestra (g)	P final bolsa + muestra (g)	P corrección	FDA (%)
110,0000	110,0000	62,0000	0,4762	0,5039	0,7538	0,9977	55,3077
110,0000	110,0000	62,0000	0,4695	0,5032	0,7464	0,9977	55,2424
110,0000	110,0000	62,0000	0,4829	0,5033	0,7547	0,9977	54,2243
110,0000	110,0000	53,0000	0,4721	0,5051	0,7406	0,9977	53,3728
110,0000	110,0000	53,0000	0,5107	0,5067	0,7766	0,9977	52,7086
110,0000	110,0000	53,0000	0,5082	0,5082	0,7756	0,9977	52,8471
110,0000	90,0000	62,0000	0,5021	0,5016	0,7796	0,9977	55,5532
110,0000	90,0000	62,0000	0,4875	0,5050	0,7650	0,9977	55,1725
110,0000	90,0000	62,0000	0,5090	0,5077	0,7924	0,9977	56,0510
110,0000	90,0000	53,0000	0,4937	0,5018	0,7704	0,9977	55,3678
110,0000	90,0000	53,0000	0,4841	0,5052	0,7650	0,9977	55,8221
110,0000	90,0000	53,0000	0,4703	0,5059	0,7433	0,9977	54,1770
130,0000	110,0000	62,0000	0,4859	0,5076	0,7555	0,9977	53,3329
130,0000	110,0000	62,0000	0,5118	0,5044	0,7763	0,9977	52,6719
130,0000	110,0000	62,0000	0,4579	0,5067	0,7281	0,9977	53,5333
130,0000	110,0000	53,0000	0,4671	0,5004	0,7267	0,9977	52,0932
130,0000	110,0000	53,0000	0,4884	0,5046	0,7503	0,9977	52,1251
130,0000	110,0000	53,0000	0,5020	0,5064	0,7648	0,9977	52,1237
130,0000	90,0000	62,0000	0,5284	0,5060	0,8024	0,9977	54,3904
130,0000	90,0000	62,0000	0,5102	0,5016	0,7854	0,9977	55,0984
130,0000	90,0000	62,0000	0,4933	0,5060	0,7675	0,9977	54,4140
130,0000	90,0000	53,0000	0,4702	0,5082	0,7343	0,9977	52,1805
130,0000	90,0000	53,0000	0,4772	0,5010	0,7421	0,9977	53,0933
130,0000	90,0000	53,0000	0,4948	0,5058	0,7681	0,9977	54,2582

P: peso

Tabla 18. Peso de la bolsa de filtración Ankom K - F 57 en blanco.

Peso de bolsa blanco FDA		
P inicial (g)	P final (g)	P corrección (C ₁)
0,4725	0,4714	0,9977

Anexo 03.2.1: ANOVA factorial – Fibra detergente ácida (FDA) para el método de expansión por explosión

Variable dependiente: FDA

Factores: Presión.
Peso de la fibra.
Humedad.

Número de casos completos: 24

Tabla 19. ANOVA factorial de FDA en el método de expansión por explosión.

FDA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	32,994	7	4,713	13,196	0,000
Intra-grupos	5,715	16	0,357		
Total	38,709	23			

Tabla 20. Prueba de los efectos inter - sujetos en función a la variable de FDA en el método de expansión por explosión.

Variable dependiente: FDA

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	32,994 ^a	7	4,713	13,196	0,000
Intersección	69900,487	1	69900,487	195702,179	0,000
Pres	11,387	1	11,387	31,881	0,000
Pes	10,661	1	10,661	29,849	0,000
Hum	9,154	1	9,154	25,630	0,000
Pres * Pes	0,033	1	0,033	0,092	0,766
Pres* Hum	0,004	1	0,004	0,011	0,917
Pes* Hum	0,443	1	0,443	1,240	0,282
Pres* Pes * Hum	1,312	1	1,312	3,672	0,073
Error	5,715	16	0,357		
Total	69939,196	24			
Total corregida	38,709	23			

a. R cuadrado = ,852 (R cuadrado corregida = ,788)

Donde: Pres: presión, Pes: peso, Hum: humedad

Tabla 21. Comparación de medias en el método de expansión por explosión en función a la variable de FDA.

HSD de Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
6,00	3	52,1167		
2,00	3	52,9789	52,9789	
8,00	3	53,1800	53,1800	
5,00	3	53,1820	53,1820	
7,00	3		54,6371	54,6371
1,00	3			54,9274
4,00	3			55,1250
3,00	3			55,5950
Sig.		0,409	0,056	0,532

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Anexo 04: Método lignina detergente ácida (LDA):

En este proceso, las muestras provienen del residuo de la digestión de fibra ácido detergente (celulosa y lignina); los que son sometidos a la digestión en la solución de ácido sulfúrico al 72% Método aplicado (Vilcanqui, 2009).

Materiales, equipos, reactivos.

Materiales

- Agitador vortex.
- Bolsas de filtración de Ankom K – F 57.
- Cronometro.
- Desecador.
- Marcador resiste a solventes.
- pH metro.
- Pipeta 5ml.

- Probeta 50 ml.
- Vaso precipitado 1000 ml.

Equipos

- Balanza analítica.
- Estufa.
- Mufla.

Reactivos

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 72%.
- Agua.

Procedimiento

- ✓ Pesar la bolsa de filtro Ankom K - F 57 (W_0), las que provienen de la digestión de FDA.
- ✓ Poner en un vaso precipitado de 1000 ml el ácido sulfúrico H_2SO_4 al 72%.
- ✓ Sumergir las bolsas de Ankom K- F 57 en el ácido sulfúrico al 72% hasta que sea recubierta completamente por un periodo de tiempo de 3 horas.
- ✓ Las bolsas deben de estar completamente secas a una temperatura ambiente antes de añadir el ácido concentrado. Si la humedad está presente en las bolsas, el calor generado por la reacción H_2SO_4 y H_2O afectará negativamente a los resultados.
- ✓ Agite las bolsas al comienzo y al menos por intervalos de 30 minutos empujando suavemente de arriba hacia abajo unas 30 veces.
- ✓ Después de 3 horas sustraer del H_2SO_4 para enjuagar con agua a chorro, hasta obtener un pH neutro.
- ✓ Secar en la estufa durante 4 horas a una temperatura de 102 ± 2 °C hasta que la muestra este seca por completa.
- ✓ Pesar la muestra seca (W_1), luego llevar a la mufla durante 3 horas a una temperatura de 525°C.
- ✓ Pesar la muestra (W_2) después del proceso de calcinación (ignición).

$$\text{LDA} = \frac{L}{S} \times (100)$$

$$L = (W_1 + W_0) - (W_2 + W_0)$$

Dónde:

W_1 : Es el peso después del secado (lignina + ceniza).

W_2 : Es el peso después del proceso de ignición (ceniza).

W_0 : Es peso de la bolsa de filtración Ankom K - F 57.

S: Peso de la muestra.

Anexo 04.1: Resultados de LDA por el método hidrotérmico

Tabla 22. Resultados de LDA en el método hidrotérmico.

Combinaciones			S		Wo		W ₁		W ₂		LDA (%)
Temperatura (°C)	Tiempo (g)	Relación (F:H ₂ O)	P muestra (g)	P bolsa inicial +lignina-ceniza (g)	P inicial bolsa (g)	P inicial bolsa corregida(g)	Lignina+ceniza (g)	P crisol (g)	P crisol+ceniza (g)	Ceniza(g)	LDA (%)
90	15	1:2	0,5019	0,4677	0,4489	0,4465	0,0212	32,4872	32,4891	0,0019	3,8404
90	15	1:2	0,5024	0,4801	0,4635	0,4610	0,0191	31,9424	31,9435	0,0011	3,5733
90	15	1:2	0,5041	0,4652	0,4505	0,4481	0,0171	37,7879	37,7886	0,0007	3,2501
90	15	1:1	0,5042	0,4800	0,4721	0,4696	0,0104	32,409	32,4097	0,0007	1,9234
90	15	1:1	0,5019	0,4518	0,4379	0,4356	0,0162	46,1512	46,1534	0,0022	2,7928
90	15	1:1	0,5032	0,4827	0,4663	0,4638	0,0189	32,4853	32,4876	0,0023	3,2924
90	10	1:2	0,5036	0,4595	0,4477	0,4453	0,0142	31,9405	31,9413	0,0008	2,6546
90	10	1:2	0,5027	0,4650	0,4558	0,4534	0,0116	37,7831	37,7834	0,0003	2,2502
90	10	1:2	0,5027	0,5488	0,5385	0,5357	0,0131	32,4064	32,4083	0,0019	2,2378
90	10	1:1	0,5014	0,4788	0,4594	0,4570	0,0218	46,1491	46,1508	0,0017	4,0149
90	10	1:1	0,5035	0,4856	0,4639	0,4614	0,0242	32,4871	32,4905	0,0034	4,1231
90	10	1:1	0,5009	0,5045	0,4827	0,4801	0,0243	33,3935	33,3966	0,0031	4,2421
80	15	1:2	0,5006	0,4969	0,4731	0,4706	0,0263	37,7866	37,7877	0,0011	5,0259
80	15	1:2	0,5030	0,5035	0,4728	0,4703	0,0332	32,407	32,4103	0,0033	5,9508
80	15	1:2	0,5021	0,4884	0,4553	0,4529	0,0355	46,1514	46,1535	0,0021	6,6463
80	15	1:1	0,5003	0,4609	0,4548	0,4524	0,0085	32,4872	32,4891	0,0019	1,3125
80	15	1:1	0,5026	0,4725	0,4615	0,4591	0,0134	33,3941	33,395	0,0009	2,4903
80	15	1:1	0,5008	0,5083	0,4951	0,4925	0,0158	37,7845	37,7849	0,0004	3,0697
80	10	1:2	0,5047	0,4759	0,4534	0,4510	0,0249	32,4073	32,4084	0,0011	4,7194
80	10	1:2	0,5022	0,4652	0,4453	0,4429	0,0222	46,1512	46,1528	0,0016	4,1076
80	10	1:2	0,5043	0,4537	0,4323	0,4300	0,0237	32,4906	32,4922	0,0016	4,3798
80	10	1:1	0,5030	0,4756	0,4568	0,4544	0,0212	33,3963	33,3976	0,0013	3,9596
80	10	1:1	0,5042	0,4777	0,4608	0,4584	0,0193	37,7867	37,7881	0,0014	3,5577
80	10	1:1	0,5016	0,4884	0,4721	0,4696	0,0188	32,4099	32,4116	0,0017	3,4087

*P: peso, F: fibra

Tabla 23. Peso de la bolsa de filtración Ankom K - F 57 en blanco.

Peso de bolsa blanco LDA		
P inicial (g)	P final (g)	P corrección(C _f)
0,4725	0,4700	0,9947

Anexo 04.1.1: ANOVA factorial – Lignina detergente ácida (LDA) para el método hidrotérmico

Variable dependiente: LDA

Factores: Temperatura.

Tiempo.

Relación fibra de *Agave* /agua (F: H₂O).

Número de casos completos: 24

Tabla 24. ANOVA factorial de LDA en el método hidrotérmico.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	30,483	7	4,355	15,319	0,000
Intra-grupos	4,548	16	0,284		
Total	35,031	23			

Tabla 25. Pruebas de los efectos inter – sujetos en función a la variable LDA en el método hidrotérmico.

Variable dependiente: LDA

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	30,483 ^a	7	4,355	15,319	0,000
Intersección	314,096	1	314,096	1104,899	0,000
Temp	4,535	1	4,535	15,955	0,001
Tiem	0,010	1	0,010	0,035	0,854
Rel	4,549	1	4,549	16,003	0,001
Temp * Tiem	0,061	1	0,061	0,216	0,649
Temp * Rel	10,158	1	10,158	35,732	0,000
Tiem * Rel	11,155	1	11,155	39,241	0,000
Temp* Tiem * Rel	0,014	1	0,014	0,049	0,828
Error	4,548	16	0,284		
Total	349,127	24			
Total corregida	35,031	23			

a. R cuadrado = ,870 (R cuadrado corregida = ,813)

Donde: Temp: temperatura, Tiem: tiempo, Rel: relación

Tabla 26. Comparación de medias en el método hidrotérmico en función a la variable de LDA.

HSD de Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
6,00	3	2,2908			
3,00	3	2,3809			
2,00	3	2,6695	2,6695		
1,00	3	3,5546	3,5546	3,5546	
8,00	3	3,6420	3,6420	3,6420	
4,00	3		4,1267	4,1267	
7,00	3			4,4023	4,4023
5,00	3				5,8743
Sig.		0,096	0,062	0,542	0,058

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Anexo 04.2: Resultados de LDA por el método de expansión por explosión.

Tabla 27. Resultados de LDA en el método de expansión por explosión.

Combinaciones			W ₀				W ₁				W ₂	
Presión (Psi)	Fibra (g)	Humedad (%)	P muestra (g)	P bolsa inicial +lignina-ceniza (g)	P inicial bolsa (g)	P inicial bolsa corregida(g)	Lignina-ceniza (g)	P crisol	P crisol +ceniza	Ceniza	LDA(%)	
110	110	62	0,5039	0,5429	0,4762	0,4737	0,0692	32,4103	32,4133	0,003	13,1414	
110	110	62	0,5032	0,5297	0,4695	0,4670	0,0627	37,7862	37,7880	0,002	12,0994	
110	110	62	0,5033	0,5516	0,4829	0,4803	0,0713	32,4894	32,4944	0,005	13,1641	
110	110	53	0,5051	0,5199	0,4721	0,4696	0,0503	33,3957	33,3981	0,002	9,4829	
110	110	53	0,5067	0,5552	0,5107	0,5080	0,0472	46,1516	46,1574	0,006	8,1709	
110	110	53	0,5082	0,5596	0,5082	0,5055	0,0541	32,4894	32,4944	0,005	9,6594	
110	90	62	0,5016	0,5877	0,5021	0,4994	0,0883	33,3957	33,3998	0,004	16,7776	
110	90	62	0,5050	0,5838	0,4875	0,4849	0,0989	37,7862	37,7910	0,005	18,6296	
110	90	62	0,5077	0,5967	0,509	0,5063	0,0904	32,4103	32,4139	0,004	17,0954	
110	90	53	0,5018	0,5919	0,4937	0,4911	0,1008	32,4894	32,4927	0,003	19,4325	
110	90	53	0,5052	0,5726	0,4841	0,4815	0,0911	37,7862	37,7866	4E-04	17,9456	
110	90	53	0,5059	0,5609	0,4703	0,4678	0,0931	33,3957	33,3985	0,003	17,8471	
130	110	62	0,5076	0,5304	0,4859	0,4833	0,0471	32,4103	32,4129	0,003	8,7610	
130	110	62	0,5044	0,554	0,5118	0,5091	0,0449	32,4894	32,4930	0,004	8,1895	
130	110	62	0,5067	0,4986	0,4579	0,4555	0,0431	33,3957	33,3967	0,001	8,3132	
130	110	53	0,5004	0,474	0,4671	0,4646	0,0094	37,7862	37,7890	0,003	1,3132	
130	110	53	0,5046	0,4926	0,4884	0,4858	0,0068	32,4103	32,4111	8E-04	1,1859	
130	110	53	0,5064	0,5077	0,502	0,4993	0,0084	32,4894	32,4917	0,002	1,1959	
130	90	62	0,5060	0,5375	0,5284	0,5256	0,0119	33,3957	33,3967	0,001	2,1533	
130	90	62	0,5016	0,5184	0,5102	0,5075	0,0109	37,7862	37,7866	4E-04	2,0932	
130	90	62	0,5060	0,5031	0,4933	0,4907	0,0124	32,4103	32,4117	0,001	2,1759	
130	90	53	0,5082	0,4863	0,4702	0,4677	0,0186	32,4894	32,4929	0,003	2,9689	
130	90	53	0,5010	0,4879	0,4772	0,4747	0,0132	33,3957	33,3981	0,002	2,1607	
130	90	53	0,5058	0,5042	0,4948	0,4922	0,0120	37,7862	37,7900	0,004	1,6248	

*P: peso

Tabla 28. Peso de la bolsa de filtración Ankom K- F 57 en blanco.

Peso de bolsa blanco LDA		
P inicial (g)	P final (g)	P corrección (C ₁)
0,4725	0,4700	0,9947

Anexo 04.2.1: ANOVA factorial – Lignina detergente ácida (LDA) para el método de expansión por explosión

Variable dependiente: LDA

Factores: Presión.
Peso de la fibra.
Humedad.

Número de casos completos: 24

Tabla 29. ANOVA factorial de LDA en el método de expansión por explosión.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	985,551	7	140,793	335,601	0,000
Intra-grupos	6,712	16	0,420		
Total	992,263	23			

Tabla 30. Pruebas de los efectos inter – sujetos en función a la variable LDA en el método de expansión por explosión.

Variable dependiente: LDA

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	985,551 ^a	7	140,793	335,601	0,000
Intersección	1936,473	1	1936,473	4615,874	0,000
Pres	718,434	1	718,434	1712,496	0,000
Pes	28,662	1	28,662	68,321	0,000
Hum	36,521	1	36,521	87,053	0,000
Pres * Pes	139,161	1	139,161	331,712	0,000
Pres * Hum	6,899	1	6,899	16,445	0,001
Pes * Hum	53,148	1	53,148	126,687	0,000
Pres * Pes* Hum	2,725	1	2,725	6,494	0,021
Error	6,712	16	0,420		
Total	2928,736	24			
Total corregida	992,263	23			

R cuadrado = ,993 (R cuadrado corregida = ,990)

Dónde: Pres: presión, Pes: peso, Hum: humedad

Tabla 31. Comparación de medias en el método de expansión por explosión en función a la variable de LDA.

HSD de Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
6,00	3	1,2317			
7,00	3	2,1408			
8,00	3	2,2515			
5,00	3		8,4212		
2,00	3		9,1044		
1,00	3			12,8016	
3,00	3				17,5009
4,00	3				18,4084
Sig.		0,553	0,889	1,000	0,678

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Anexo 05: Resultados de la celulosa y hemicelulosa después del tratamiento hidrotérmico.

Tabla 32. Resultados de la celulosa y hemicelulosa en el tratamiento hidrotérmico.

Combinaciones			Celulosa	Hemicelulosa
Temperatura (°C)	Tiempo (g)	Relación (F:H ₂ O)		
90	15	1:2	46,4773712	17,1737081
90	15	1:2	44,7306263	22,9057568
90	15	1:2	48,6540736	23,0252727
90	15	1:1	51,8050744	16,9503061
90	15	1:1	48,2372023	19,985855
90	15	1:1	48,8907731	18,4571648
90	10	1:2	49,2401671	15,8453286
90	10	1:2	51,273022	14,6564111
90	10	1:2	49,7721194	15,5662458
90	10	1:1	44,363545	18,1767855
90	10	1:1	45,3863516	15,6864414
90	10	1:1	47,3098432	15,6061456
80	15	1:2	47,9108201	0,0907022
80	15	1:2	48,7610855	1,101906
80	15	1:2	47,1596763	1,07928202
80	15	1:1	49,1689788	9,63931996
80	15	1:1	49,9717602	4,57915764
80	15	1:1	48,318558	7,41574101
80	10	1:2	46,034594	2,11454301
80	10	1:2	45,3222342	3,79610735
80	10	1:2	45,195144	3,11196231
80	10	1:1	44,3830057	0,71248729
80	10	1:1	45,3261933	0,875525
80	10	1:1	45,2971486	0,72422213

Donde: F: fibra de *Agave*

Tabla 33. Comparación de medias de la celulosa en método hidrotermico.

HSD de Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
8,00	3	45,0021		
7,00	3	45,5173		
4,00	3	45,6866	45,6866	
1,00	3	46,6207	46,6207	46,6207
5,00	3	47,9439	47,9439	47,9439
6,00	3		49,1531	49,1531
2,00	3			49,6444
3,00	3			50,0951
Sig.		0,146	0,059	0,058

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Tabla 34. Comparación de medias de hemicelulosa en método hidrotermico.

HSD de Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
5,00	3	0,7573			
8,00	3	0,7707			
7,00	3	3,0075	3,0075		
6,00	3		7,2114		
3,00	3			15,3560	
4,00	3			16,4898	16,4898
2,00	3			18,4645	18,4645
1,00	3				21,0349
Sig.		0,740	0,115	0,389	0,074

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Anexo 06: Resultados de la celulosa y hemicelulosa después del tratamiento de expansión por explosión.

Tabla 35. Resultados de la celulosa y hemicelulosa en el tratamiento de expansión por explosión.

Combinaciones			% Celulosa	% Hemicelulosa
Presión (Psi)	Fibra (g)	Humedad (%)		
110,0000	110,0000	62,0000	42,1688901	0,68505267
110,0000	110,0000	62,0000	43,1456456	0,4987862
110,0000	110,0000	62,0000	41,0628224	0,32088438
110,0000	110,0000	53,0000	43,8925332	1,72563104
110,0000	110,0000	53,0000	44,54052	1,9503596
110,0000	110,0000	53,0000	43,1905199	1,89773793
110,0000	90,0000	62,0000	38,7783685	0,45640746
110,0000	90,0000	62,0000	36,5456546	0,83522123
110,0000	90,0000	62,0000	38,9584108	0,77954677
110,0000	90,0000	53,0000	35,93806	3,6165336
110,0000	90,0000	53,0000	37,8791824	2,98344768
110,0000	90,0000	53,0000	36,3325793	3,84984111
130,0000	110,0000	62,0000	44,5745265	3,76116666
130,0000	110,0000	62,0000	44,485241	3,64480053
130,0000	110,0000	62,0000	45,2226681	2,94282213
130,0000	110,0000	53,0000	50,7825739	1,09064171
130,0000	110,0000	53,0000	50,9419122	1,04569325
130,0000	110,0000	53,0000	50,9306068	1,16860941
130,0000	90,0000	62,0000	52,2399941	0,73654906
130,0000	90,0000	62,0000	53,0080336	0,13510943
130,0000	90,0000	62,0000	52,2407847	0,76455882
130,0000	90,0000	53,0000	49,2142493	1,86869743
130,0000	90,0000	53,0000	50,9353441	1,48142018
130,0000	90,0000	53,0000	52,6362052	1,40681769

Tabla 36. Comparación de medias de celulosa en el método de expansión por explosión.

HSD de Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4,00	3	36,7166		
3,00	3	38,0942		
1,00	3		42,1258	
2,00	3		43,8745	
5,00	3		44,7608	
6,00	3			50,8850
8,00	3			50,9286
7,00	3			52,4963
Sig.		0,676	0,069	0,504

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Tabla 37. Comparación de medias de hemicelulosa en el método de expansión por explosión.

HSD de Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
1,00	3	0,5016		
7,00	3	0,5454		
3,00	3	0,6904		
6,00	3	1,1016	1,1016	
8,00	3		1,5856	
2,00	3		1,8579	
5,00	3			3,4496
4,00	3			3,4832
Sig.		0,253	0,084	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Anexo 07: Determinación de azúcares reductores (AR)

Método DNS descrito por (Miller 1959, Ghose 1987, Alarcón 2010, Dutta 2008)

Materiales, equipos, reactivos.

Materiales

- Bagueta.
- Fiola 25, 50 ml.
- Gradilla.
- Pipeta de 5, 10 ml.
- Termómetro.
- Tubo de ensayo 15 ml.

Equipo

- Balanza analítica.
- Baño maría.
- Espectrofotómetro UV.

Reactivo

- 3, 5 ácido dinitrosalicílico.
- Ácido clorhídrico (0,1 N HCl).
- Agua destilada.
- Fenol.
- Fenolftaleína.
- Glucosa anhidra.
- Hidróxido de sodio (NaOH).
- Na bisulfito.
- Sal de rochelle (tartrato de sodio, potasio).

Preparación de la solución ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS)

Para la preparación de la solución de DNS se utilizó el método descrito por (Ghose 1987, Dutta 2008), esta solución DNS se debe almacenar en una botella marrón o color ámbar, y conservar a 4°C en un refrigerador.

Reactivo DNS

Mezclar

- Agua destilada 1416 ml.
- 3,5- ácido dinitrosalicílico 10,6 g.
- NaOH 19,8 g.

Disolver lo anterior y luego agregar

- Sal de Rochelle (Na-K Tartrato) 306 g.
- Fenol (derretir a 50°C) 7,6 ml (8.132g).
- Bisulfito/ sodio 8,3 g.

Verificación del reactivo DNS

- Tomar 3mL del reactivo DNS anteriormente preparado.
- Agregue 2 gotas de fenolftaleína.
- Titule con HCl 0.1 N.
- Debería tomar de 5 – 6 ml HCl.

Procedimiento de la cuantificación de los azúcares reductores

Colocar 0.5 ml de muestra en un tubo de ensayo de 15 ml y luego añadir 3 ml de reactivo de DNS agitar con un vórtex. Las mezclas se colocan en un baño isotérmico durante 15 minutos a temperatura de ebullición (100°C); una vez que cumpla el tiempo indicado enfriar en un baño de agua fría o hielo hasta llegar a la temperatura ambiente, posteriormente se añade 10 ml de agua destilada la cual se diluye y homogeniza con un vórtex, luego leer la absorbancia en un espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 540 nm contra un blanco, el blanco contiene 0.5 ml de agua destilada en vez de la muestra y 3ml de DNS (Miller 1959, Ghose 1987, Alarcón 2010, Dutta 2008).

La cuantificación de los azúcares reductores en el presente proyecto de investigación fue calculada usando la formula descrita por (Hernández *et al.*, 2009) como se ve descrito en la siguiente ecuación.

$$Y = \frac{(C * V)}{W} * 100$$

Donde C es la concentración de azúcar reductor (g/L), V es el volumen total de la fase líquida (L) y W es el peso seco del material lignocelulósico correspondiente (g) y Y es la producción de los azúcares expresados en porcentajes de azúcares en el peso seco.

Curva estándar de glucosa

La preparación de la curva estándar de glucosa se enmarca en un rango de 0.2-5.0 mg de glucosa por ml o por 0.5 ml las que son apropiadas (Ghose, 1987), las que se detallan en la figura 01.

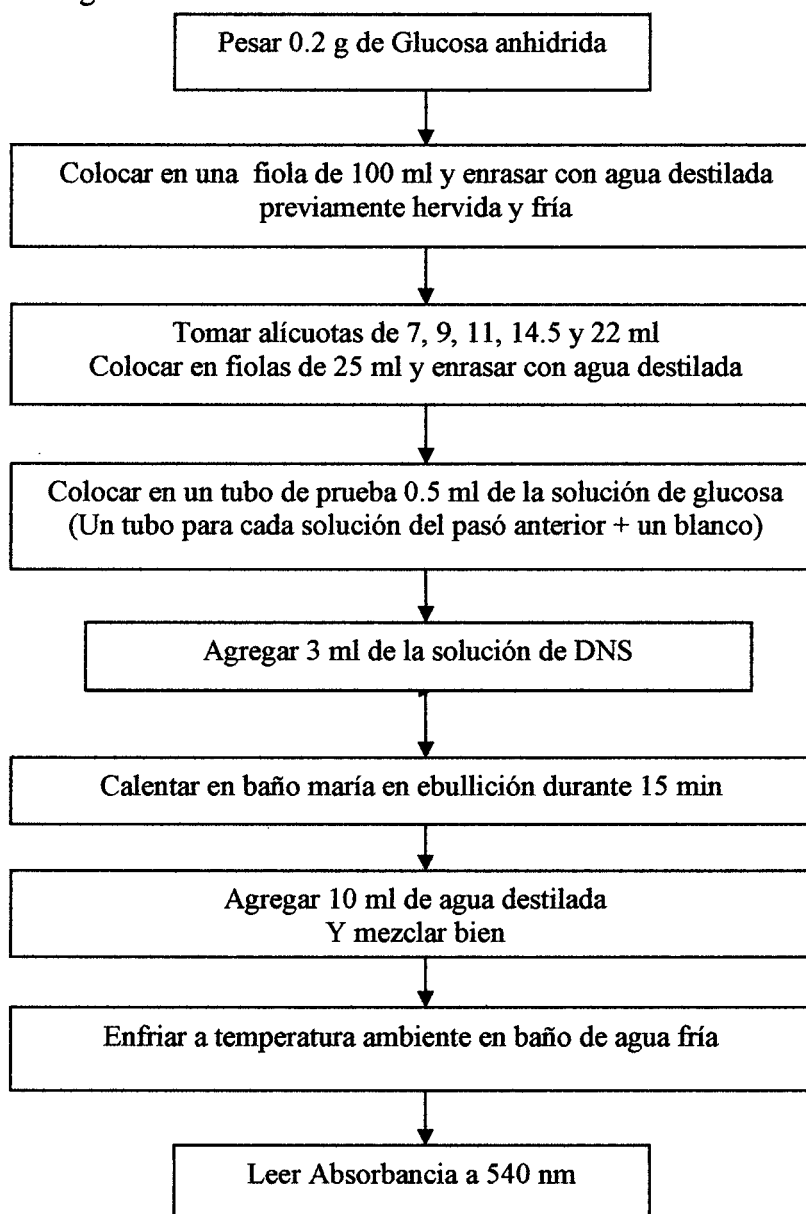


Figura 01: Procedimiento de la curva estándar.

Calculo de la concentración de glucosa en 25 ml de solución (0.2g/100ml)

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

$$0.002\text{g/ml} * 7\text{ml} = C_2 * 25\text{ml}$$

$$C_2 = 0.00056\text{g/ml}$$

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

$$0.002\text{g/ml} * 9\text{ml} = C_2 * 25\text{ml}$$

$$C_2 = 0.000721\text{g/ml}$$

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

$$0.002\text{g/ml} * 22\text{ml} = C_2 * 25\text{ml}$$

$$C_2 = 0.001763\text{g/ml}$$

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

$$0.002\text{g/ml} * 11\text{ml} = C_2 * 25\text{ml}$$

$$C_2 = 0.000881\text{g/ml}$$

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

$$0.002\text{g/ml} * 14.5\text{ml} = C_2 * 25\text{ml}$$

$$C_2 = 0.001161\text{g/ml}$$

Tabla 38. Diluciones de glucosa para la formación de la curva patrón.

Alicuotas (ml)	Glucosa (g)	Alicuota agua (ml)	Agua añadida (ml)	Agua total (ml)	Concentración	
					(g/ml)	(g/L)
7	0,014	6,986	18	24,986	0,00056	0,56
9	0,018	8,982	16	24,982	0,000721	0,721
11	0,022	10,972	14	24,978	0,000881	0,881
14,5	0,036	14,471	10,5	24,971	0,001161	1,161
22	0,044	21,956	3	24,956	0,001763	1,763

Se elaboró una curva patrón donde se graficó en el eje de las abscisas (eje “x”); el promedio de la absorbancia determinada a 540 nm y en el eje de las ordenadas (eje “y”) el promedio de la concentración de glucosa se determinó en (g/L) en una ecuación lineal recta que relaciona a los parámetros:

$$y = mx + b$$

Donde “y” representa la absorbancia que se determinó a 540 nm, “x” representa la concentración de glucosa que se determina en g/L, “m” representa la pendiente de la línea recta y “b” la intersección del origen en la tabla 39 se muestra la lectura de las de las distintas concentraciones a 540 nm de abs.

Tabla 39. Lectura de las alícuotas a 540 nm de Abs en las distintas concentraciones.

Alicuotas (ml)	Lectura (1) 540 (nm) Abs	Lectura (2) 540 (nm) Abs	Promedio Abs 540 (nm)
7	0,43	0,438	0,434
9	0,547	0,558	0,5525
11	0,683	0,694	0,6885
14,5	0,891	0,89	0,8905
22	1,311	1,303	1,307

La curva patrón de glucosa se muestra en la figura 02 con la que se determinó la cantidad de azúcares por el método DNS

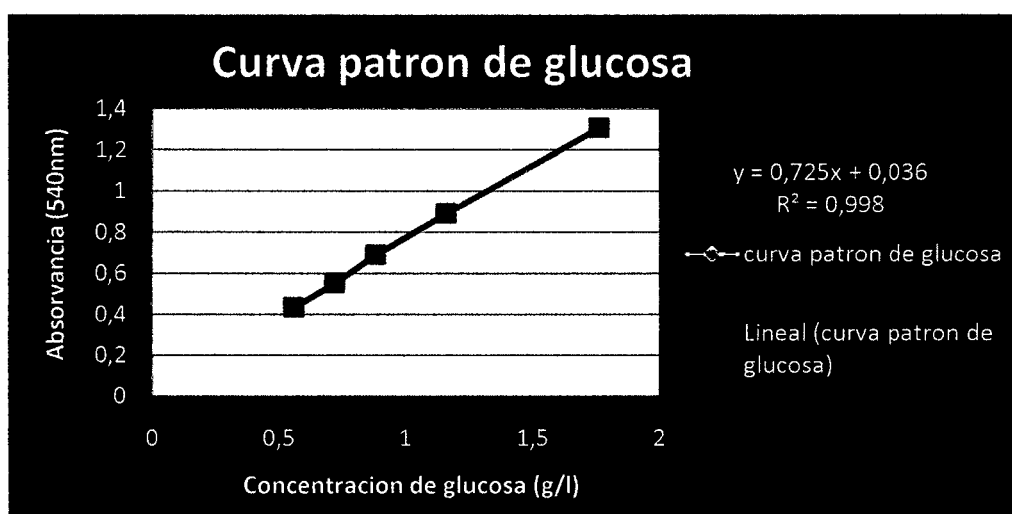


Figura 02. Curva patrón de glucosa.

Ecuación de regresión de la curva patrón de glucosa

$$y = 0.725x + 0.036 \text{ y su } R^2 = 0.998$$

Anexo 07.1: Resultados de los azúcares reductores (AR) en el método hidrotérmico.

Tabla 40. Resultado de los azúcares reductores (AR) en el método hidrotérmico.

Combinación			Absorbancia A 540 nm	Ecuaación lineal (g/L) AR	Factor de dilución (g/L) AR	Volumen gastado NAOH (ml)	Dilución (ml)	Conversión	Peso muestra	% AR	Sabemos que 33,33g es para un litro	AR (g/L)
Minutos	H ₂ SO ₄ (%)	Temperatura ° C	Dilución 1:1 (V/V)	Y= 0,725X+0,036	2		30	(L)	(g)		33,33	
30	2	121	1,911	2,5862	5,1724	6,4	36,4	0,0364	1	18,8276		6,2752
30	2	121	1,884	2,5490	5,0979	5,9	35,9	0,0359	1	18,3016		6,0999
30	2	121	1,911	2,5862	5,1724	6,6	36,6	0,0366	1	18,9310		6,3097
30	4	121	2,17	2,9434	5,8869	12,9	42,9	0,0429	1	25,2548		8,4174
30	4	121	2,141	2,9034	5,8069	13	43	0,043	1	24,9697		8,3224
30	4	121	2,104	2,8524	5,7048	12,4	42,4	0,0424	1	24,1885		8,0620
30	8	121	1,793	2,4234	4,8469	26,7	56,7	0,0567	1	27,4819		9,1597
30	8	121	1,785	2,4124	4,8248	26,3	56,3	0,0563	1	27,1638		9,0537
30	8	121	1,901	2,5724	5,1448	26,2	56,2	0,0562	1	28,9139		9,6370
60	2	121	2,304	3,1283	6,2566	5,9	35,9	0,0359	1	22,4610		7,4863
60	2	121	2,341	3,1793	6,3586	6	36	0,036	1	22,8910		7,6296
60	2	121	2,301	3,1241	6,2483	6,2	36,2	0,0362	1	22,6188		7,5388
60	4	121	2,28	3,0952	6,1903	12,2	42,2	0,0422	1	26,1233		8,7069
60	4	121	2,185	2,9641	5,9283	11,5	41,5	0,0415	1	24,6023		8,2000
60	4	121	2,144	2,9076	5,8152	13	43	0,043	1	25,0052		8,3342
60	8	121	1,789	2,4179	4,8359	24,9	54,9	0,0549	1	26,5489		8,8487
60	8	121	1,883	2,5476	5,0952	24,6	54,6	0,0546	1	27,8196		9,2723
60	8	121	1,835	2,4814	4,9628	26,9	56,9	0,0569	1	28,2381		9,4118
90	2	121	2,426	3,2966	6,5931	6,7	36,7	0,0367	1	24,1967		8,0648
90	2	121	2,336	3,1724	6,3448	7,1	37,1	0,0371	1	23,5393		7,8457
90	2	121	2,455	3,3366	6,6731	6,9	36,9	0,0369	1	24,6238		8,2071
90	4	121	2,24	3,0400	6,0800	12,1	42,1	0,0421	1	25,5968		8,5314
90	4	121	2,259	3,0662	6,1324	11,6	41,6	0,0416	1	25,5108		8,5028
90	4	121	2,209	2,9972	5,9945	11,9	41,9	0,0419	1	25,1169		8,3715
90	8	121	1,613	2,1752	4,3503	29	59	0,059	1	25,6670		8,5548
90	8	121	1,771	2,3931	4,7862	28,6	58,6	0,0586	1	28,0472		9,3481
90	8	121	1,607	2,1669	4,3338	32	62	0,062	1	26,8695		8,9556

Anexo 07.1.1: ANOVA factorial – Azúcar reductor (AR) para el método hidrotérmico

Variable dependiente: AR

Factores: Tiempo
 Concentración

Número de casos completos: 27

Tabla 41. ANOVA factorial de los AR en el método hidrotermico.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	21,345	8	2,668	47,927	0,000
Intra-grupos	1,002	18	0,056		
Total	22,347	26			

Tabla 42. Pruebas de los efectos inter – sujetos en función a la variable de AR para el método hidrotermico.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	21,345 ^a	8	2,668	47,927	0,000
Intersección	1844,250	1	1844,250	33127,999	0,000
Tiemp	1,596	2	0,798	14,336	0,000
Concent	15,841	2	7,920	142,274	0,000
Tiemp* Concent	3,908	4	0,977	17,549	0,000
Error	1,002	18	0,056		
Total	1866,597	27			
Total corregida	22,347	26			

a. R cuadrado = ,955 (R cuadrado corregida = ,935)

Dónde: Tiemp: tiempo, Concent: concentración

Tabla 43. Comparación de medias en el método hidrotérmico función a la variable de AR.

HSD de Tukey*

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
1,00	3	6,2283				
4,00	3		7,5516			
7,00	3		8,0392	8,0392		
2,00	3			8,2673		
5,00	3			8,4137	8,4137	
8,00	3			8,4685	8,4685	
9,00	3				8,9529	8,9529
6,00	3					9,1776
3,00	3					9,2835
Sig.		1,000	0,280	0,429	0,183	0,730

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Anexo 07.2: Resultados de los azúcares reductores (AR) del método de expansión por explosión

Tabla 44. Resultados de los AR en el método de expansión por explosión.

Combinación			Absorbancia a 540 nm	Ecuación lineal	Factor de dilución	Volumen gastado NAOH (ml)	Dilución (ml)	Conversión	Peso muestra	% (AR)	Sabemos que 33,33g es para un litro	AR(g/L)
Tiempo Minutos	Concentración H ₂ SO ₄ (%)	Temperatura °C	dilución 1/1 (V/V)	Y= 0,725X+0,036	2		30	(L)	(g)		33,33	
30	2	121	2,179	2,9559	5,9117	6,6	36,6	0,0366	1	21,6369		7,21158
30	2	121	2,142	2,9048	5,8097	6,7	36,7	0,0367	1	21,3214		7,10643
30	2	121	2,144	2,9076	5,8152	6,3	36,3	0,0363	1	21,1091		7,03565
30	4	121	2,227	3,0221	6,0441	10,7	40,7	0,0407	1	24,5996		8,19906
30	4	121	2,294	3,1145	6,2290	11,1	41,1	0,0411	1	25,6010		8,53283
30	4	121	2,328	3,1614	6,3228	12,2	42,2	0,0422	1	26,6820		8,89312
30	8	121	1,955	2,6469	5,2938	23	53	0,053	1	28,0571		9,35143
30	8	121	1,993	2,6993	5,3986	24,4	54,4	0,0544	1	29,3685		9,78852
30	8	121	1,9	2,5710	5,1421	23,1	53,1	0,0531	1	27,3044		9,10055
60	2	121	2,349	3,1903	6,3807	6,2	36,2	0,0362	1	23,0981		7,69860
60	2	121	2,365	3,2124	6,4248	5,1	35,1	0,0351	1	22,5511		7,51630
60	2	121	2,382	3,2359	6,4717	6,5	36,5	0,0365	1	23,6218		7,87314
60	4	121	2,231	3,0276	6,0552	12,8	42,8	0,0428	1	25,9161		8,63785
60	4	121	2,242	3,0428	6,0855	12,4	42,4	0,0424	1	25,8026		8,60000
60	4	121	2,253	3,0579	6,1159	12	42	0,042	1	25,6866		8,56135
60		121	1,923	2,6028	5,2055	23,3	53,3	0,0533	1	27,7454		9,24754
60		121	1,934	2,6179	5,2359	23,1	53,1	0,0531	1	27,8024		9,26655
60		121	1,902	2,5738	5,1476	23,6	53,6	0,0536	1	27,5911		9,19610
90	2	121	2,397	3,2566	6,5131	5,6	35,6	0,0356	1	23,1866		7,72811
90	2	121	2,401	3,2621	6,5241	6,6	36,6	0,0366	1	23,8783		7,95865
90	2	121	2,439	3,3145	6,6290	5,7	35,7	0,0357	1	23,6654		7,88768
90	4	121	2,289	3,1076	6,2152	11,7	41,7	0,0417	1	25,9173		8,63823
90	4	121	2,282	3,0979	6,1959	12,2	42,2	0,0422	1	26,1465		8,71464
90	4	121	2,241	3,0414	6,0828	12	42	0,042	1	25,5476		8,51501
90		121	1,905	2,5779	5,1559	24,1	54,1	0,0541	1	27,8932		9,29681
90		121	1,924	2,6041	5,2083	23,6	53,6	0,0536	1	27,9164		9,30452
90		121	1,899	2,5697	5,1393	23,3	53,3	0,0533	1	27,3925		9,12993

Anexo 07.2.1: ANOVA factorial – Azúcar reductor (AR) para el método de expansión por explosión.

Variable dependiente: AR

Factores: Tiempo.
Concentración.

Número de casos completos: 27

Tabla 45. ANOVA factorial de los AR en el método de expansión por explosión

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	14,768	8	1,846	52,245	0,000
Intra-grupos	0,636	18	0,035		
Total	15,404	26			

Tabla 46. Pruebas de los efectos inter-sujetos en función a la variable de AR en el método de expansión por expansión.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	14,768 ^a	8	1,846	52,245	0,000
Intersección	1942,093	1	1942,093	54966,490	0,000
Tiemp	0,224	2	0,112	3,172	0,066
Concent	13,789	2	6,894	195,127	0,000
Tiemp * Concent	0,755	4	0,189	5,342	0,005
Error	0,636	18	0,035		
Total	1957,497	27			
Total corregida	15,404	26			

a. R cuadrado = ,959 (R cuadrado corregida = ,940)

Dónde: Tiemp: tiempo, Concent: concentración

Tabla 47. Comparación de medias en el método de expansión por explosión función a la variable de AR.

HSD de Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
1,00	3	7,1179			
4,00	3		7,6960		
7,00	3		7,8581		
2,00	3			8,5417	
5,00	3			8,5997	
8,00	3			8,6226	
6,00	3				9,2367
9,00	3				9,2438
3,00	3				9,4135
Sig.		1,000	0,974	1,000	0,957

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Anexo 08: Comparación de medias en los tratamientos de mayor rendimiento de azúcares reductores durante la hidrólisis ácida en los métodos hidrotérmico y expansión por explosión.

Tabla 48. Comparación de medias de los mayores rendimientos de AR en los métodos hidrotérmicos y expansión por explosión.

HSD de Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
3,00	3	8,9510
2,00	3	9,1767
5,00	3	9,2400
6,00	3	9,2433
1,00	3	9,2830
4,00	3	9,4100
Sig.		0,392

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Anexo 09: Fotografías del estudio de investigación

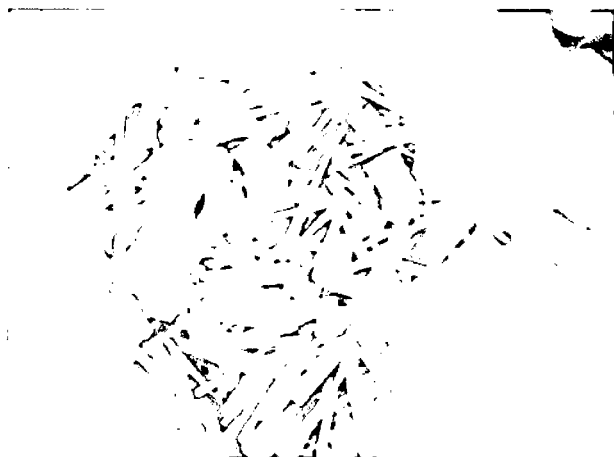


Foto 1. Fibra picada de *Agave*



Foto 2. Licuado de la fibra

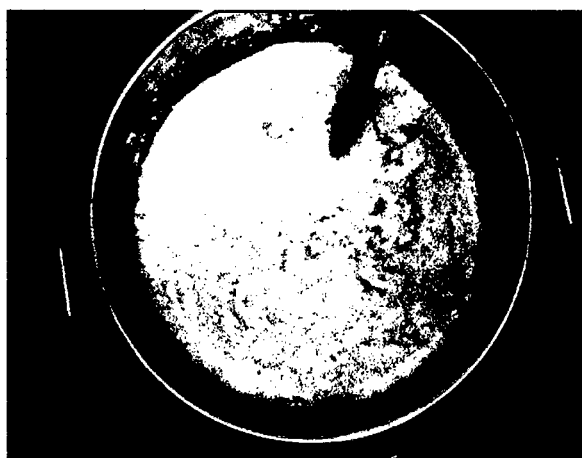


Foto 3. Extracción hidrotérmica



Foto 4. Secado



Foto 5. Fibra seca después método I

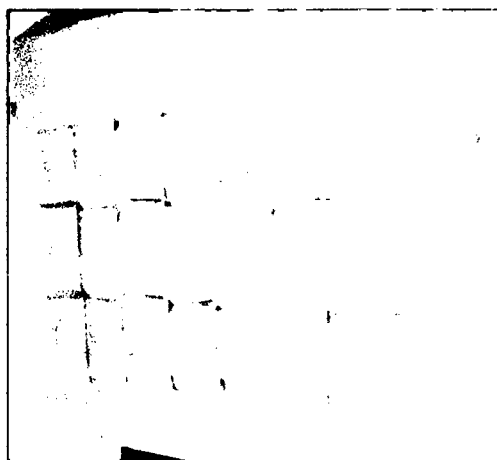


Foto 6. Fibra seca para el método II



Foto7. Molienda



Foto 8. Muestra de ambos métodos



Foto 9. Extracción por método II



Foto 10. Secado después del método II

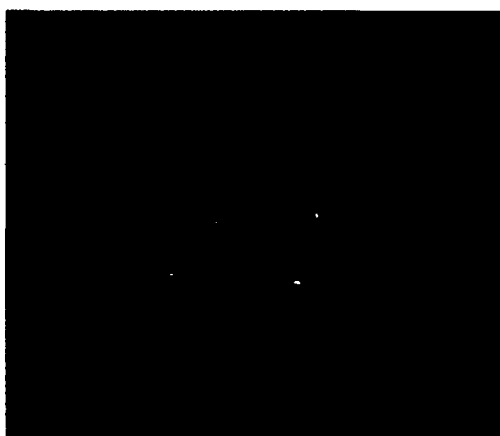


Foto 11. Lignina detergente ácida

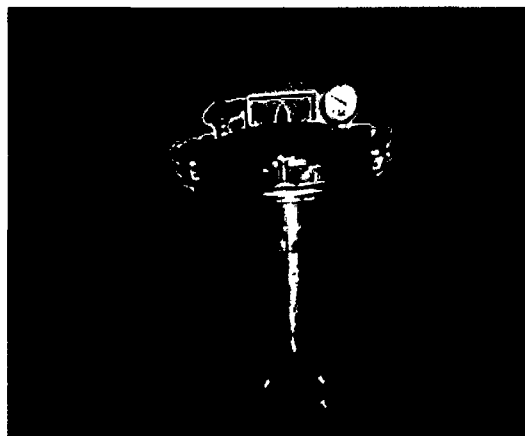


Foto 12. Hidrolisis



Foto 13. Muestra hidrolizada (método I)

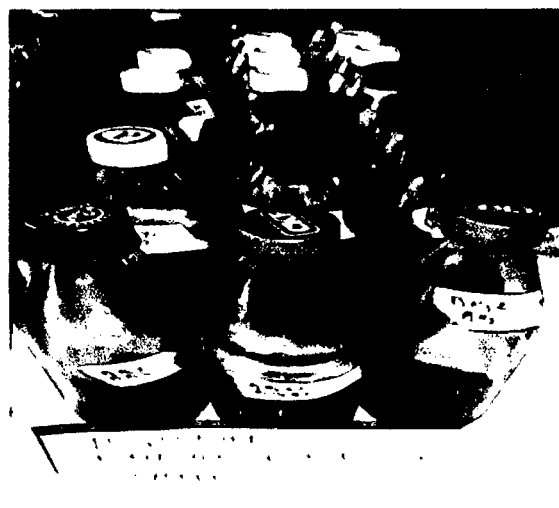


Foto 14. Muestra hidrolizada (método II)

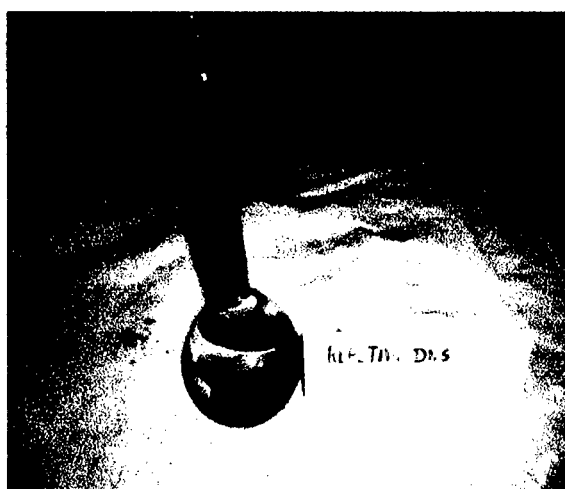


Foto 15. Reactivo DNS

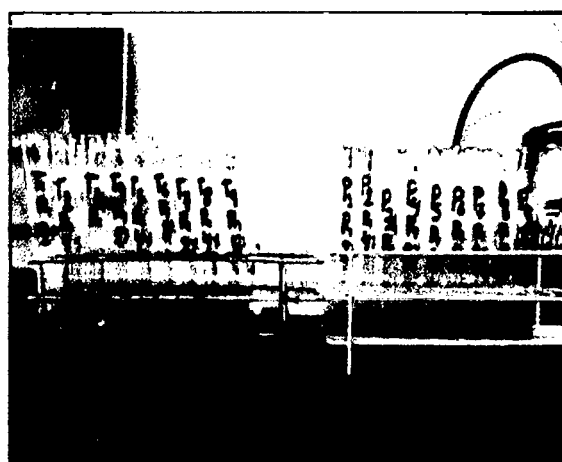


Foto 16. Dilución de reactivo DNS y muestra

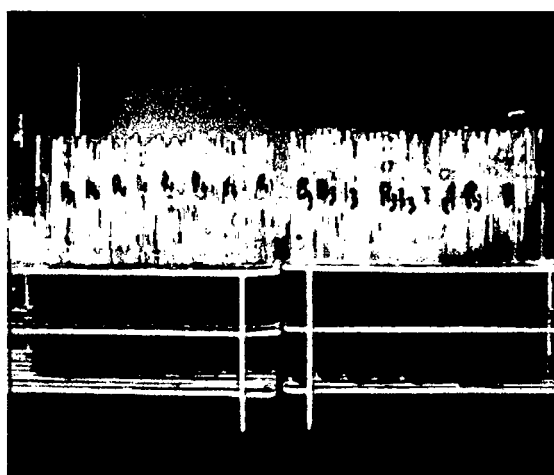


Foto 17. Muestra para determinar AR

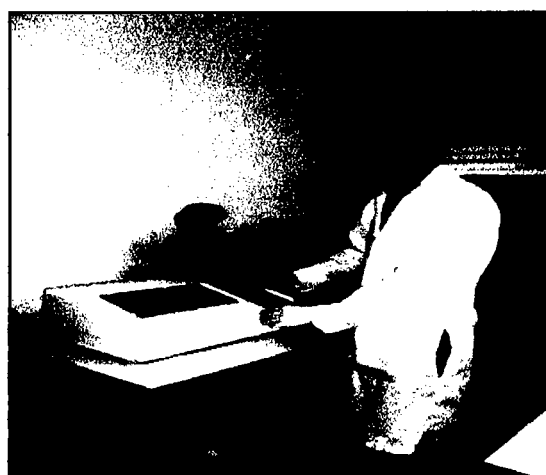


Foto 18. Determinación de AR