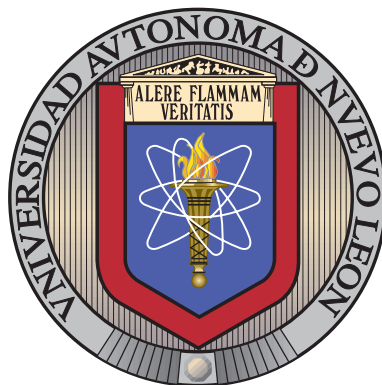


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA



OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ÁCIDA PARA
LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES TOTALES A
PARTIR DE ALGAS PARDAS (*Sargassum spp.*)

POR

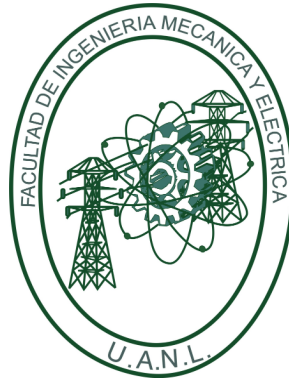
NORINELIA PUC BLANCO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
CON ORIENTACIÓN EN ENERGÍAS TÉRMICA Y RENOVABLE

SEPTIEMBRE 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA



OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ÁCIDA PARA
LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES TOTALES A
PARTIR DE ALGAS PARDAS (*Sargassum spp.*)

POR

NORINELIA PUC BLANCO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
CON ORIENTACIÓN EN ENERGÍAS TÉRMICA Y RENOVABLE

SEPTIEMBRE 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica
Posgrado

Los miembros del Comité de Evaluación de Tesis recomendamos que la Tesis “Optimización de la hidrólisis ácida para la obtención de azúcares totales a partir de algas pardas (*Sargassum spp.*)”, realizada por la estudiante Norinelia Puc Blanco, con número de matrícula 1988544, sea aceptada para su defensa como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Ingeniería con Orientación en Energías Térmica y Renovable.

El Comité de Evaluación de Tesis

Dr. Simón Martínez Martínez
Director

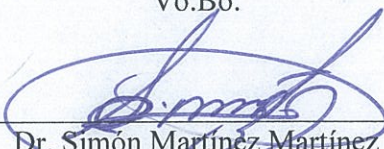
Dr. Oscar Alejandro de la Garza de León
Co-director

Dra. Violeta Yasmín Mena Cervantes
Revisor

Dr. Daniel de la Rosa Urbalejo
Revisor

M.C. Miguel García Yera
Revisor

Vo.Bo.


Dr. Simón Martínez Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado



Institución 190001

Programa 507507

Acta Núm. 3934

Ciudad Universitaria, a 22 de septiembre de 2021.

*Agradezco a mis padres, mi hermana,
mi novio, cuñado, familia, amigos, compañeros,
CONACYT y profesores que fueron parte
de que todo esto sea posible.*

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica (FIME) por el apoyo brindado durante mi estancia en el Programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería con Orientación en Energías Térmica y Renovable. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) del Gobierno de México, por la financiación de mis estudios de maestría (beca: 733701), y por apoyar esta investigación a través del proyecto: 315787 del LaNDACBio.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	IV
Resumen	XVI
1. Introducción	1
1.1. Motivación	2
1.1.1. Situación energética: energías fósiles y renovables.	2
1.1.2. Afluencia masiva del <i>Sargassum spp.</i>	9
1.2. Antecedentes	20
1.2.1. Biomasa	20
1.2.2. Bioetanol	20
1.3. Hipótesis	25
1.4. Objetivo General	26
1.5. Objetivos específicos	26
2. Marco teórico	27
2.1. Biomasa	28

2.1.1. Biomasa Lignocelulósica	28
2.1.2. Celulosa	29
2.1.3. Hemicelulosa	29
2.1.4. Lignina	30
2.2. Biocombustibles	33
2.2.1. Biocombustibles de primera generación	33
2.2.2. Biocombustibles de segunda generación	34
2.2.3. Biocombustibles de tercera generación	35
2.3. Bioetanol	40
2.4. <i>Sargassum spp.</i>	43
2.5. Desarrollo del proceso de producción de bioetanol.	47
2.5.1. Hidrólisis enzimática	50
2.5.2. Hidrólisis ácida	51
2.5.3. Hidrólisis ácida diluida	52
2.5.4. Hidrólisis ácida concentrada	53
2.6. Detoxificación	54
2.7. Fermentación	55
2.8. <i>Saccharomyces cerevisiae.</i>	56
3. Herramientas y métodos	57
3.1. Método de optimización	58

3.1.1. Metodología de superficie de respuesta (RSM)	58
3.1.2. Método de máxima pendiente en ascenso/descenso	59
3.1.3. Localización del punto estacionario	60
3.1.4. Diseños de superficie de respuesta	61
3.1.5. Diseños para modelos de segundo orden	61
3.2. Análisis de azúcares	63
3.2.1. Prueba de Fehling	63
3.2.2. Espectrofotometría	64
3.2.3. Método fenol-sulfúrico	65
3.3. Análisis de alcoholes	65
3.3.1. Cromatografía de gases	65
3.3.2. Técnica Headspace	66
4. Metodología	68
4.1. Optimización del proceso de bioetanol de la etapa de hidrólisis ácida mediante el Método de Superficie de Respuesta	69
4.2. Proceso de producción del bioetanol	73
4.2.1. Pretratamiento	74
4.2.2. Hidrólisis ácida	75
4.2.3. Detoxificación	76
4.2.4. Fermentación	77

4.2.5. Destilación	79
4.3. Análisis de azúcares	79
4.3.1. Prueba de Fehling	79
4.3.2. Método Fenol-Sulfúrico	80
4.4. Análisis de bioetanol	82
4.4.1. Cromatografía de gases – Técnica Headspace	82
5. Resultados	84
5.1. Análisis de azúcares	85
5.1.1. Análisis de resultados para la determinación de azúcares mediante la prueba de Fehling.	85
5.1.2. Análisis de resultados de terminación de azúcares mediante espectrofotometría por el método Fenol-Sulfúrico	87
5.2. Hidrólisis ácida	89
5.3. Análisis de bioetanol	95
5.3.1. Rendimiento teórico del bioetanol	95
5.3.2. Cromatografía de gases mediante técnica headspace.	97
6. Conclusiones y trabajos futuros	100
6.1. Conclusiones	101
6.2. Futuros trabajos	102
A. Análisis de azúcares por el método Fenol-Sulfúrico	104

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1. Producción mundial de energía primaria, 2017. 14,030.071 MMtep . . .	3
1.2. Consumo mundial de energía por energético.	4
1.3. Consumo total mundial de energía por sector, 2017. 9,717.29 MMtep	4
1.4. Demanda mundial de energía renovable en el sector transporte en el Escenario de Políticas Declaradas, 2018-2040.	6
1.5. Evolución de la producción y el consumo nacional de la energía. . . .	6
1.6. Estructura de la producción de energía primaria, 2018 (PJ).	7
1.7. Producción de energías renovables.	8
1.8. Evolución de la capacidad de generación eléctrica con bagazo (MW).	9
1.9. Serie de tiempo mensual vista satelital de MERIS MCI de recuentos de detección de sargazo. Tomada de “Satellite images suggest a new Sargassum source region in 2011, por Gower, <i>et al.</i> , 2019	10
1.10. Cobertura de área de sargazo promedio mensual en el Mar Caribe y el Océano Atlántico central	11
1.11. Distribución del Sargazo en el Gran Cinturón del Sargazo Atlántico. De The great Atlantic Sargassum belt, por M. Wang, <i>et al.</i> , 2019, Science, (364).	12

1.12. Corrientes causantes de la distribución del <i>Sargassum</i> spp. De “Supplementary Materials for The great Atlantic <i>Sargassum</i> belt,”, M. Wang, <i>et al.</i> , 2019, <i>Science</i> (364).	13
1.13. Mar de los Sargazos. De Report of the wider Caribbean and western mid-Atlantic regional workshop to facilitate the description of ecologically or biologically significant marine areas por Convention on Biological Diversity	14
1.14. Mapas de áreas aproximadas cubiertas por los pastos marinos <i>Thalassia testudinum</i> , <i>Halodule wrightii</i> , el alga calcárea <i>Halimeda incrassata</i> y las algas de deriva/epífitas en costas del Caribe Mexicano en 2008 (antes del Sbt) y 2016 (después del Sbt). B-B: La abundancia como escala de Braun-Blanquet (B-B): 0.5 (escala r: raro y +: pocos individuos), 1 (varios individuos o cubrir hasta un 5 %), 2 (muchos individuos o cubren del 6 al 26 %), (cobertura del 26 al 50 %), 4 (cobertura (51-75 %), 5 (cubre 76-100 %).	16
1.15. Número de colonias y mortalidad parcial media de seis especies de corales escleractinios en un sitio de monitoreo de Puerto Morelos antes (2013) y después (2016) del <i>Sargassum-browntide</i> (Sbt).	17
1.16. Efectos de las mareas marrones de sargazo a un ecosistema marino. De “Severe impacts of brown tides caused by <i>Sargassum</i> spp. on near-shore Caribbean seagrass communities”, por B. I. van Tussenbroek et al. , 2017 <i>Mar. Pollut. Bull.</i> , vol. 122, no. 1–2, pp. 272–281.	18
1.17. Abundancia relativa de cinco grupos de fauna observados muertos a causa de la afluencia masiva en el Caribe Mexicano de 2018.	19
2.1. Estructura de la biomasa lignocelulósica.	28

2.2. Estructura de la lignina de madera suave. De cap. General, por Ashok Pandey, et al. Biofuels. Alternative feedstocks and conversion processes, 10, 2011, Academic Press.	31
2.3. a) Estructura de la celulosa (compuesta por uniones de D-glucosa unidas por enlaces β -1, 4 glucósidos). b) Estructura de la hemicelulosa. c) Estructura de la lignina. Advances in Genetic Manipulation of Lignocellulose to Reduce Biomass Recalcitrance and Enhance Biofuel Production in Bioenergy Crops, M. Madadi <i>et al.</i> , 5, 2017, Journal of Plant Biochemistry Physiology. DOI: 10.4172/2329-9029.1000182 . . .	32
2.4. Proceso fotosintético de las microalgas. https://www.eoi.es/blogs/merme/microalgas-y-biocombustibles/	38
2.5. Estructura molecular del bioetanol. https://cremeroleo.de/en/products/bioethanol.html	40
2.6. Sargassum natans y fluitans. De Identification and chemical studies of pelagic masses of Sargassum natans (Linnaeus) Gaillon and S. fluitans (Borgesen) Borgesen (brown algae), found offshore in Ondo State, Nigeria, por O. O. Oyesiku et al., 2014, African Journal of Biotechnology, Vol. 13(10), pp. 1188-1193.	44
2.7. Procesos generales de la producción de biocombustibles a partir de material lignoceluloso. Algae Energy. Algae as a New Source of Biodiesel, por M. F. Demirbas, Ayhan, Demirbas, 2010, 1st ed. Springer-Verlag London.	48
2.8. Proceso de producción de biocombustibles a partir de algas pardas.	49
2.9. Representación esquemática de la hidrólisis de material lignocelulósico. De Advances in bioethanol, por P. Bajpai, 2013, 1st ed., Springer.	50

2.10. Composición del bagazo de la caña y principales inhibidores. De “Hidrólisis ácida de materiales lignocelulosicos y detoxificación por pervaporación,”, por O. J. Jaramillo-Pineda, 2013, Universidad Nacional de Colombia, 2013.	54
3.1. De izquierda a derecha se pueden apreciar los puntos estacionarios: mínimo, máximo centro.	61
3.2. DCC inscrito correspondiente a k igual a tres factores	63
3.3. Representación de la reacción positiva y negativa de la prueba de Fehling.	64
3.4. Representación esquemática de la espectrofotometría.	64
3.5. Cromatógrafo Bruker 450 GC.	66
3.6. Representación de la técnica de Headspace.	67
4.1. Proceso de producción de bioetanol a partir de <i>Sargassum spp.</i>	73
4.2. <i>Sargassum spp.</i> triturado y tamizado	74
4.3. <i>Medición de la masa del Sargassum spp.</i>	75
4.4. Representación esquemática del proceso de hidrólisis.	76
4.5. Proceso de detoxificación	77
4.6. Levadura comercial <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	78
4.7. Proceso de Fermentación.	78
4.8. Destilación del bioetanol.	79
4.9. Reactivo A y B de Fehling (lado izquierdo), reacción de Fehling (lado derecho).	80

4.10. Extracción de la muestra de bioetanol.	82
5.1. Resultado positivo del ensayo Fehling para la muestra 1 (x_1 : 0.5 M; x_2 : 30 min; x_3 : 150 rpm) (izquierda). Resultado positivo del ensayo Fehling para la muestra 2 (x_1 : 2 M; x_2 : 30 min; x_3 : 150 rpm (derecha). 86	86
5.2. Resultado positivo del ensayo Fehling para la muestra 11 (x_1 : 1.25 M; x_2 : 75 min; x_3 : 225 rpm)	86
5.3. Curva de calibración de la glucosa de referencia.	88
5.4. Gráfica de la superficie de respuesta para tiempo de 30 min.	91
5.5. Gráfica de la superficie de respuesta para tiempo de 75 min..	92
5.6. Gráfica de la superficie de respuesta para tiempo de 120 min.	92
5.7. Gráfica de análisis comparativo de la concentración de azúcares de diferentes tipos de biomasa.	93
5.8. Datos de optimización obtenidos del software Minitab.	94
5.9. Resultados del punto óptimo de cada variable.	94
5.10. Cromatograma del etanol de referencia.	98
5.11. Cromatograma: Resultado positivo de la cromatografía para la mues- tra 11 (Concentración de reactivo: 2 M, Tiempo de reacción: 30 min, Agitación: 150 rpm).	98
5.12. Cromatograma: Resultado positivo de la cromatografía para la mues- tra 11 (Concentración de reactivo: 2 M, Tiempo de reacción: 120 min, Agitación: 300 rpm).	99

ÍNDICE DE TABLAS

2.1. Propiedades fisicoquímicas del bioetanol.	41
2.2. Morfología de las especies de <i>Sargassum</i> : <i>S. natans</i> y <i>S. Fluitans</i> . . .	44
2.3. Contenido de minerales de la mezcla de <i>S. natans</i> y <i>S. Fluitans</i> . . .	45
2.4. Análisis de humedad total (%) de las dos especies de <i>Sargassum</i> . .	45
2.5. Resumen de las propiedades proximales (%) de las dos especies de <i>Sargassum</i>	46
4.1. Codificación de variables	71
4.2. Matriz de experimentos	72
4.3. Realización de los estándares del método fenol-ácido Sulfúrico	81
4.4. Volúmenes de reactivos a utilizar en las muestras con el método Fenol- ácido Sulfúrico.	81
5.1. Resultados obtenidos de la prueba de Fehling (✓) indican un resultado positivo (presencia de azúcares) en cada una de las pruebas	85
5.2. Resultados de las absorbancias de la glucosa de referencia.	87
5.3. Resultado de las concentraciones de azúcares totales.	89

5.4. Resultado de las concentraciones de azúcares totales.	90
5.5. Resultados obtenidos del rendimiento teórico del bioetanol para cada una de las muestras estudiadas.	96
5.6. Resultados obtenidos del rendimiento teórico del bioetanol para cada una de las muestras estudiadas.	97

RESUMEN

La biomasa de algas es una fuente con gran potencial para la producción de bioetanol, debido a que contiene una alta concentración de carbohidratos y bajo contenido de lignina. Además, desde el año 2011 hubo un incremento masivo de algas pardas (*Sargassum spp.*) que crecen en el océano y son dispersas a diferentes costas por las corrientes marinas lo que causa un gran daño a los ecosistemas marinos, a la economía ya que gran parte de las algas llegan a playas turistas. Por lo tanto, en esta investigación se utilizaron algas pardas como materia prima para producción de bicombustibles. Sin embargo, una desventaja del uso de algas como biomasa para producción de bioetanol es el proceso de producción, ya que requiere de altos costos de producción y tiempo. Por lo que, uno de los mayores retos para la obtención de dicho biocombustible es determinar el punto óptimo de la hidrólisis ácida, el cual, nos determinará las condiciones adecuadas para obtener la mayor concentración de azúcares fermentables.

Por lo que, en este trabajo se optimizó el proceso de hidrólisis ácida mediante el Método de Superficie de Respuesta (RSM) a partir de 3 variables: concentración de H_2SO_4 (x_1), tiempo (x_2) y velocidad de agitación (x_3) a nivel laboratorio. Se espera encontrar el punto óptimo de cada variable, el cual se tomará como referencia para la producción de bioetanol.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

En este capítulo se presenta la motivación que condujo al desarrollo del presente estudio, mostrando los antecedentes e investigaciones de trabajos ya desarrollados para el área de conocimiento. Por último, se expone el planteamiento general de la tesis, que contiene la hipótesis a validar, el objetivo general y los objetivos específicos planteados en esta investigación.

1.1 MOTIVACIÓN

Los gases de efecto invernadero tales como el dióxido de carbono (CO_2), el óxido nitroso (N_2O), el metano (CH_4) y el ozono (O_3) han incrementado considerablemente en los últimos años, siendo los combustibles fósiles una de las principales fuentes de estos gases, principalmente del CO_2 . Además de los riesgos ambientales para el aire, suelo y agua, otra de las preocupaciones es la producción sostenible de estos combustibles dado que la demanda aumenta exponencialmente. Dos factores que impulsan el futuro y uso de los combustibles fósiles son la economía y la política energética. El sector energético actualmente, se encuentra dominado por los combustibles ya antes mencionados, debido a que sus costos son menores a los de energías renovables. De igual manera, existen acuerdos y programas internacionales que tienen como objetivo regular y mitigar el cambio climático, principalmente el efecto invernadero. Por esta razón, se han investigado nuevas fuentes alternativas de combustibles, los cuales mitiguen los problemas ambientales, sean de una fuente renovable y sostenible, además de una optimización del proceso de producción.

1.1.1 SITUACIÓN ENERGÉTICA: ENERGÍAS FÓSILES Y RENOVABLES.

La energía es un componente importante ya que sin esta el desarrollo tecnológico estaría limitado y áreas como la educación, salud y viviendas se verían afectados.

Por este motivo, es importante detallar sobre la producción, consumo y demanda de esta. De acuerdo con el “Balance Nacional de Energía, 2018”, la energía

primaria¹ producida en ese año fue 14,030 millones de toneladas equivalentes de petróleo (MMtep), siendo 3.2% más respecto al año anterior [1].

China, Estados Unidos, Rusia, Arabia Saudita e India fueron los países con mayor producción de energía y México ocupó el decimoquinto con de la energía que se produce en el mundo.

En la Figura 1.1 se pueden observar las principales energías producidas son el crudo (31.9%), el carbón y derivados (26.86%), el gas natural (22.54%), mientras que las renovables se encontraron en cuarto lugar con (13.78%), seguido de la nucleenergía (4.91%).

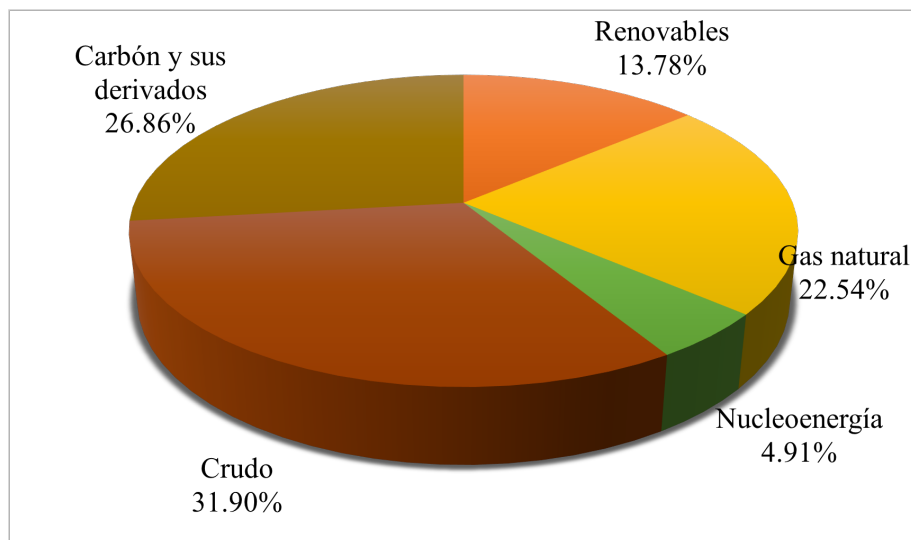


Figura 1.1: Producción mundial de energía primaria, 2017.

14,030.071 MMtep

En cuanto, al consumo mundial de energía en 2017 fue 9,717.22 MMtep, en los cuales China, Estados Unidos, India, Rusia, Japón fueron los países que mayor consumo mostraron, a diferencia de México se ubicó en el lugar

¹La energía primaria comprende aquellos productos energéticos que se extraen o captan directamente de recursos naturales (carbón mineral, petróleo, condensados, gas natural, nucleenergía, hidroenergía, energía eólica y solar, bagazo de caña, leña y biogás).

decimosexto. Los petrolíferos siguen siendo los más consumidos con el 41 % del consumo de energía internacional (Figura 1.2).

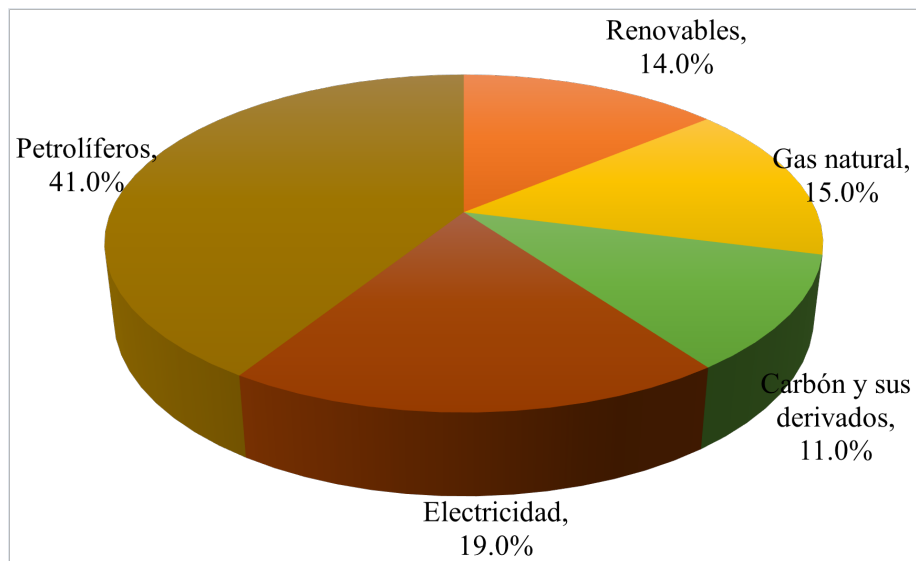


Figura 1.2: Consumo mundial de energía por energético.

Cabe mencionar que los principales consumidores por sector económico son la industria y el sector transporte con 2,820.88 MMtep y 2,808.14 MMtep, respectivamente, obteniendo 0.45 % de diferencia estadística entre ambos (Figura 1.3).

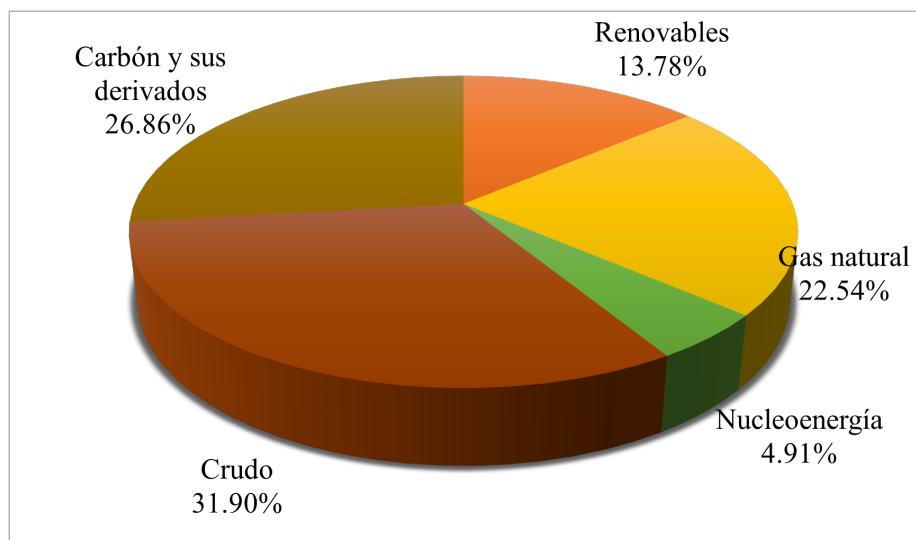


Figura 1.3: Consumo total mundial de energía por sector, 2017.

9,717.29 MMtep

La demanda de petróleo incrementó continuamente en el 2018, y Estados Unidos fue la fuente fundamental del crecimiento de esto. Los principales aumentos en la demanda de productos derivados del petróleo provienen de la gasolina y el diésel, pero también hubo contribuciones considerables de etano, gas licuado de petróleo (GLP) y nafta, ya que el uso del petróleo como materia prima petroquímica continúa creciendo en importancia [2].

De acuerdo con el Escenario de Políticas Declaradas, en 2025 el crecimiento de la demanda será persistente, pero el crecimiento se ralentiza a partir de entonces y se determina que la demanda alcanzará 106 millones de barriles por día (mb/d) en 2040. En el Escenario de Desarrollo Sostenible, la escala, el alcance y la velocidad de los cambios en el panorama energético representan un panorama diferente: la demanda pronto alcanzaría su punto máximo y caería a menos de 67 mb/d en 2040 [2].

En la última década se ha mostrado un fuerte crecimiento en el despliegue de tecnologías de energías renovables, principalmente del sector eléctrico debido a las reducciones de costos para la energía solar y eólica.

De acuerdo con lo reportado en el Escenario de Políticas Declaradas reportadas por la Agencia Internacional de Energía (por sus siglas en inglés IEA), para 2040 la contribución de las energías renovables en el sector transporte se triplicará alrededor de 300 millones de toneladas equivalentes de petróleo (Mtep) de los cuales tres cuartas partes provienen de biocombustibles (Figura 1.4). En el Escenario de Desarrollo Sostenible, en el sector del transporte, se proyecta que el consumo de energía de fuentes renovables aumentará a 600 Mtep, con biocombustibles que representan alrededor del 60% y la electricidad proveniente de fuentes renovables consumidas por vehículos eléctricos y ferrocarril representa el resto [3].

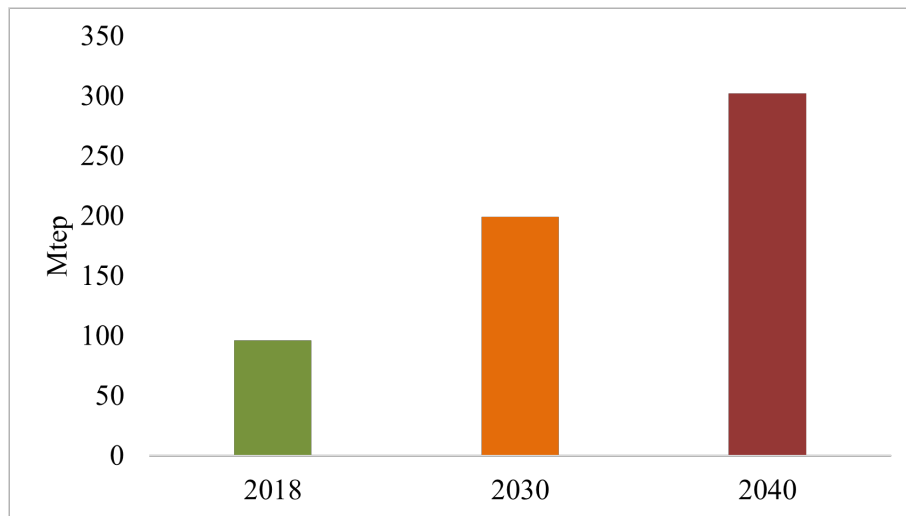


Figura 1.4: Demanda mundial de energía renovable en el sector transporte en el Escenario de Políticas Declaradas, 2018-2040.

Por otra parte, en México, como se puede observar en la Figura 1.5 en 2018 en México el consumo de energía fue 29.8% a la producción de energía primaria, siendo 9,236.86 PJ el consumo total [1].

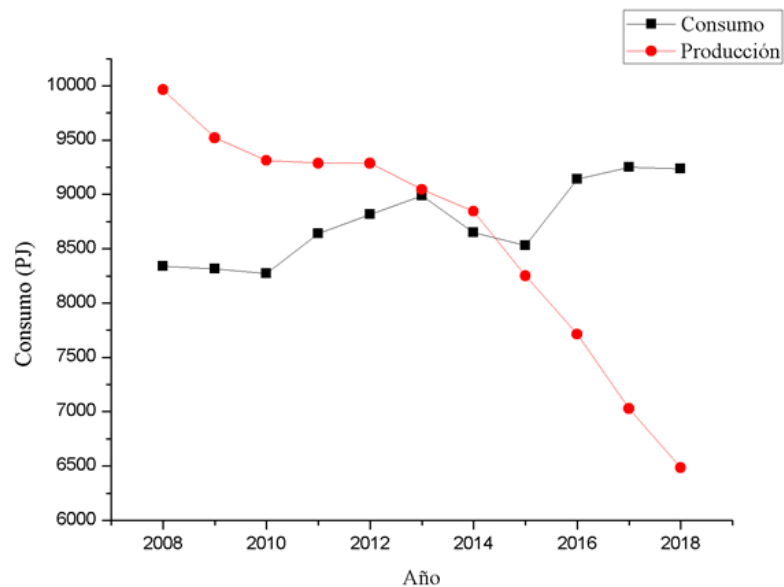


Figura 1.5: Evolución de la producción y el consumo nacional de la energía.

Es importante mencionar que el 2018 para México fue el cuarto año en el que tuvo que requerir de las importaciones de energía, las cuales le ayudaron a cubrir su demanda energética, ya que la producción de hidrocarburos se redujo desde 2012. En el 2018, la producción de petróleo crudo siguió siendo la mayor de las energías primarias producidas.

De 2017 a 2018 se observó un aumento de producción de los bioenergéticos. El biogás por ejemplo, tuvo un aumento del 12.9% mientras que la de biomasa fue 1.0% más. En la Figura 1.6 se puede observar una gráfica general de la producción de energía primaria, como se puede observar el petróleo es el que más se produce, sin embargo, las energías renovables aumentaron en comparación a años anteriores.

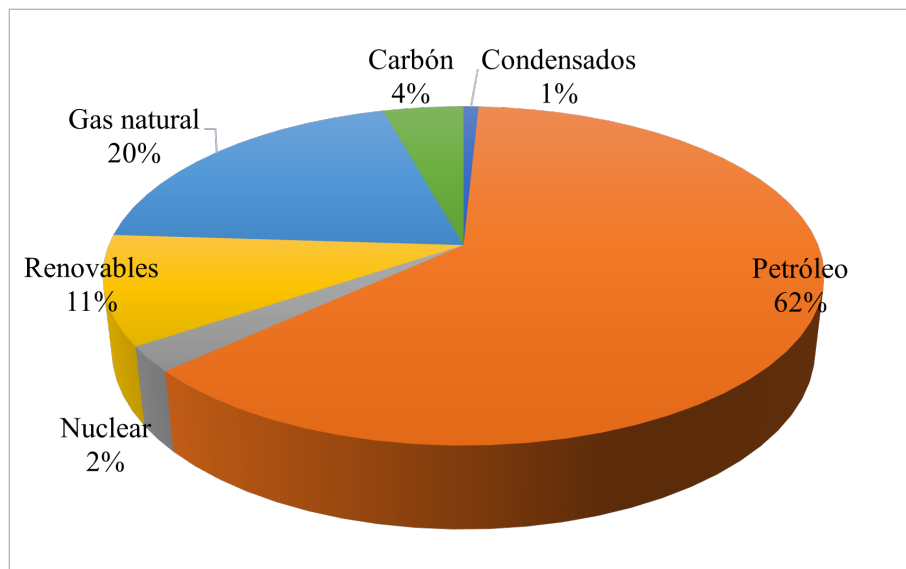


Figura 1.6: Estructura de la producción de energía primaria, 2018 (PJ).

Cómo se observó en Figura 1.6 de la producción de energías solo el 10.4% es de energías renovables, las cuales como se observa en la Figura 1.7 se dividen de la siguiente manera:

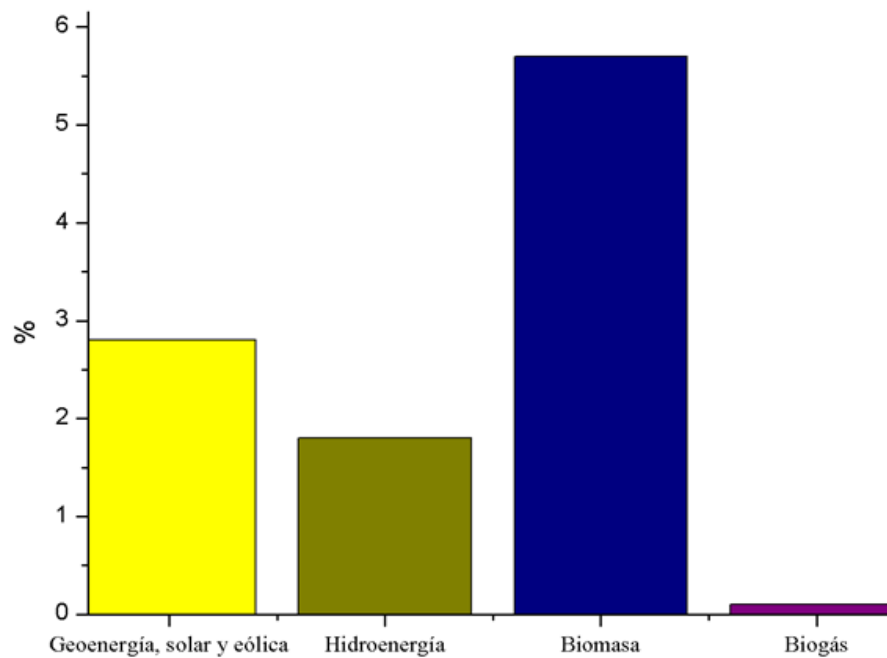


Figura 1.7: Producción de energías renovables.

México, tiene un herramienta de política energética, llamada “Prospectiva de Energías Renovables 2018-2032” en la cual se plantean políticas para que las energías renovables crezcan entre 2018 y 2032.

Con respecto al uso de biomasa para la generación de energía, entre 2007 y 2017 la capacidad instalada de energía eléctrica a partir de bioenergía fue de 996 MW, cabe mencionar, que a lo largo de los años ha incrementado considerablemente (1.8). Aunque las energías que presentaron mayor tasa de crecimiento anual promedio con 47.6 y 43.2, fueron la solar y eólica, respectivamente [4].

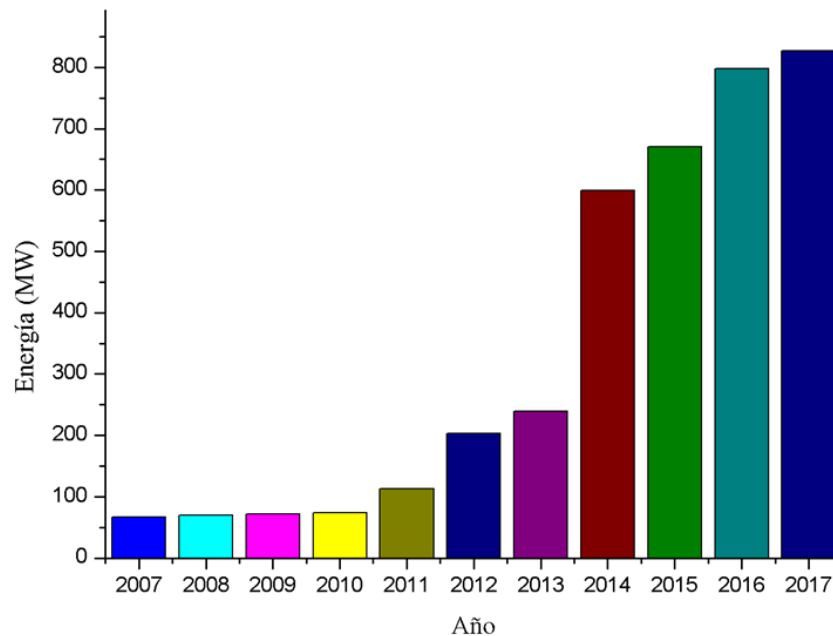


Figura 1.8: Evolución de la capacidad de generación eléctrica con bagazo (MW).

En el documento “Prospectiva de Energías Renovables 2018-2032”, se hace mención del uso y calidad de los biocombustibles, que son unos de los puntos claves de esta investigación.

En 2017, en La Republica Mexicana a excepción de las Zonas Metropolitanas (Guadalajara, Monterrey y Valle de México) se permitió el uso de etanol anhidrido en una proporción del 5.8 % de acuerdo con la NOM-016-CRE-”016, la cual pretende tener una diversidad de energía [4].

1.1.2 AFLUENCIA MASIVA DEL *Sargassum spp.*

En los últimos años el florecimiento de las macroalgas pardas ha incrementado significativamente a nivel global. Durante el verano de 2011 se informó ampliamente de un importante «evento de sargazo» en el Caribe, cuando grandes cantidades de sargazo pelágico (*Sargassum natans* o *Sargassum fluitans*) llegaron a la costa en las

playas [5]. De igual manera, Gower, *et al.*, 2011, realizó un estudio donde se observa la acumulación del sargazo desde una vista satelital a partir del abril de 2005 hasta agosto de 2011 como se muestra en la Figura 1.9, también se observa que en 2011 hubo un incremento superior a los años anteriores [5].

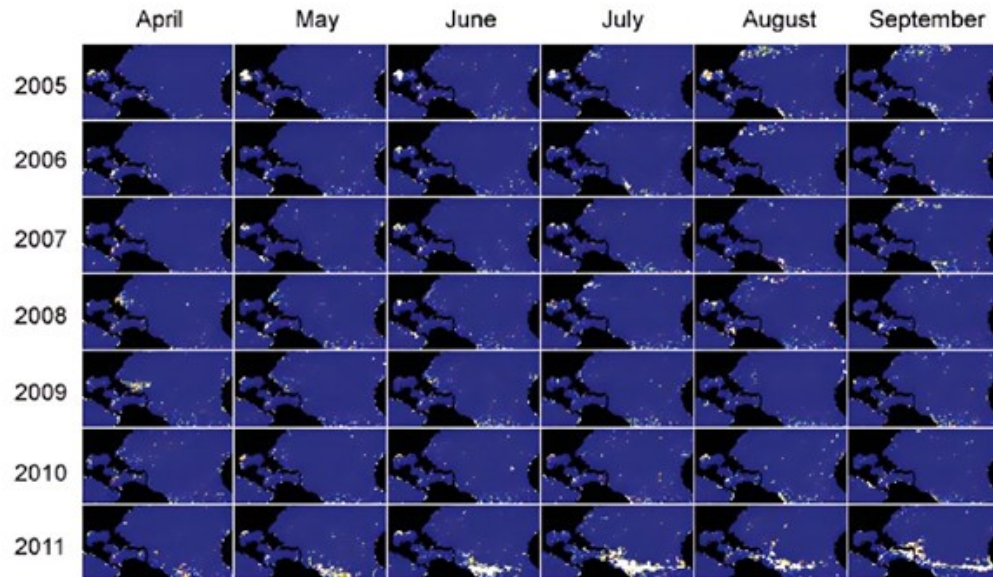


Figura 1.9: Serie de tiempo mensual vista satelital de MERIS MCI de recuentos de detección de sargazo. Tomada de “Satellite images suggest a new Sargassum source region in 2011, por Gower, *et al.*, 2019

En 2011 y 2012 se informaron inundaciones en el área del Amazonas, pero no se ha establecido ningún vínculo con el Mar de los zargazos [5].

De acuerdo con datos reportado de Wang *et al.*, 2019, en la década de 2000 al 2010 en el Atlántico Central se observa una baja reproducción de *Sargassum* (Figura 1.10), con pequeñas cantidades ocasionales de la desembocadura del río Amazonas [6]. Sin embargo, la primera floración masiva de sargazo en el Atlántico Central comenzó en 2011 [5] y, la floración se extendió desde África occidental hasta convertirse en un Gran Cinturón del Zargazo Atlántico (por su siglas en inglés: GASB) que se extendió desde África occidental hasta el mar Caribe y el golfo de México .

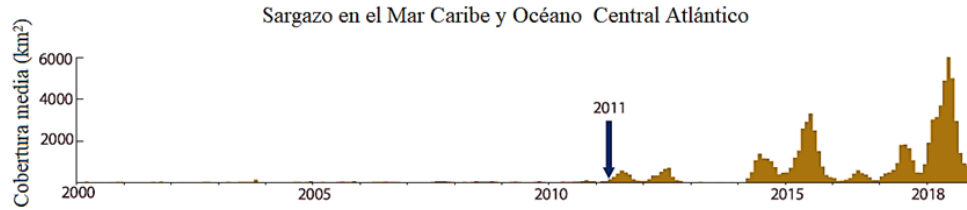


Figura 1.10: Cobertura de área de sargazo promedio mensual en el Mar Caribe y el Océano Atlántico central

De igual manera, reportan que uno de los factores de la floración abundante de *Sargassum se* debe a las descargas de nutrientes del río Amazonas y la variabilidad de las temperaturas oceánicas. En la Figura 1.11 se puede observar la distribución del gran cinturón del sargazo Atlántico desde una vista satelital de los meses de julio a partir de 2011 y hasta julio de 2018. En 2013 se observó que no hubo florecimientos, no obstante, en 2014 se observa una mayor abundancia que en 2011.

En 2015, aunque la tasa de crecimiento inicial de *Sargassum* no fue tan alta como en 2014, la población de semillas fue mucho mayor que en años anteriores. En 2016 y 2017 la tasa de crecimiento y semillas fue menor que los años anteriores, sin embargo, como se muestra en la Figura 11, para 2018 el Gran cinturón del sargazo Atlántico mostró la cobertura más alta, extendiéndose > 8850 km y transportando una biomasa húmeda de > 9 millones de toneladas (> 20 millones de toneladas en junio de 2018).

Otro factor que se considera que pudo provocar el florecimiento masivo de *Sargassum* fue la baja salinidad debido a las descargas de agua dulce provenientes del río Amazonas y un mayor suministro de nutrientes de los procesos de surgencia y menor Temperatura de la Superficie del Mar en el Atlántico centro-este desde el invierno de 2011 a la primavera de 2012 [6].

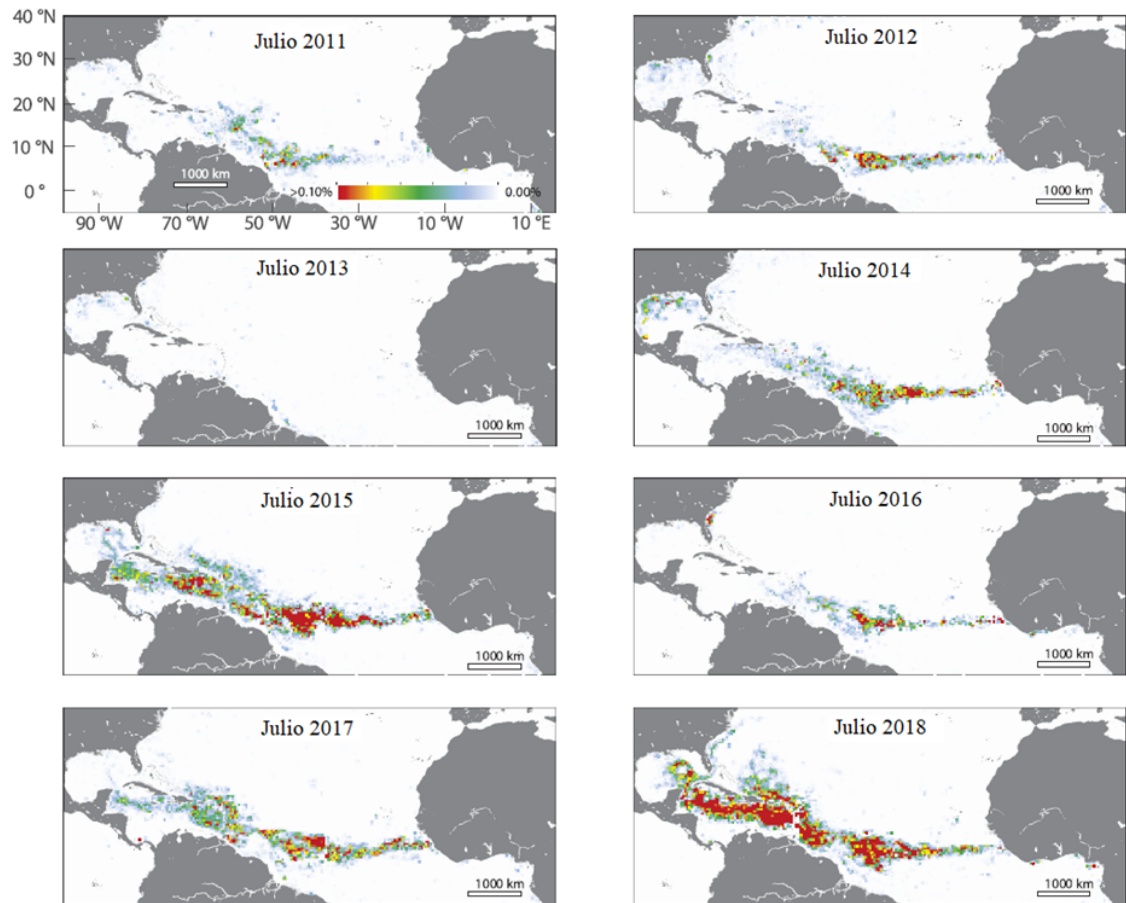


Figura 1.11: Distribución del Sargazo en el Gran Cinturón del Sargazo Atlántico. De The great Atlantic Sargassum belt, por M. Wang, *et al.*, 2019, Science, (364).

Aunque pueden existir múltiples fuentes de sargazo, la forma del GASB es consistente con la advección por los patrones de circulación oceánica en el Atlántico tropical [6]. Algunas de las corrientes causantes de la distribución del *Sargassum* y formación del GASB son la corriente del Norte de Brasil, corriente Norte Ecuatorial, contracorriente Norte Ecuatorial, corrientes de las Antillas, corriente de Florida y la corriente del Golfo (Figura 1.12) [7].

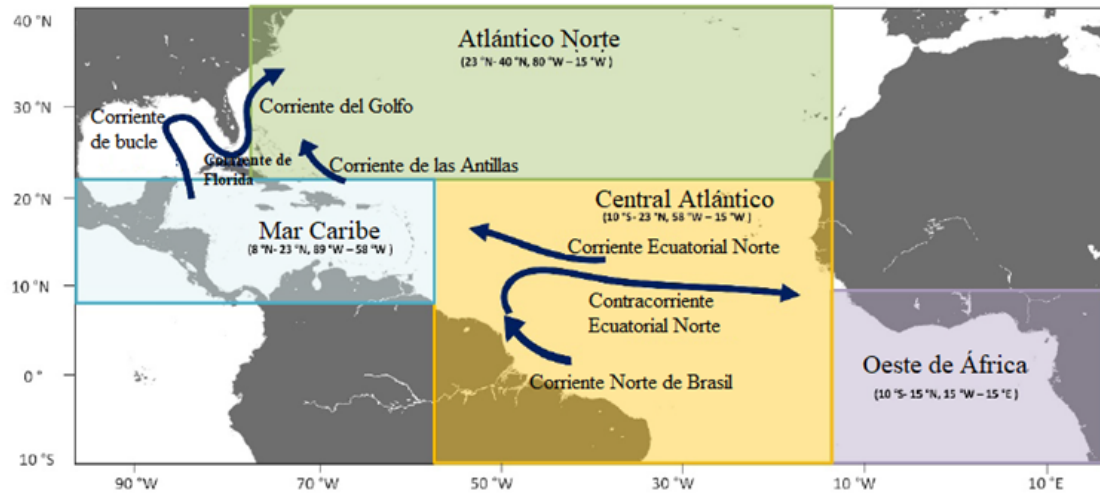


Figura 1.12: Corrientes causantes de la distribución del *Sargassum* spp. De “Supplementary Materials for The great Atlantic Sargassum belt,”, M. Wang, *et al.*, 2019, Science (364).

Desde hace muchos años se descubrió que existe una isla que está conformada por estas dos algas, llamada el “Mar de los Sargazos”. El mar de los Sargazos (Figura 1.13) está limitado por todos lados por el sentido de las agujas del reloj de las principales corrientes oceánicas: la corriente Gtilf y la deriva del Atlántico norte forman los límites occidental y norte, la corriente de Canarias forma un límite oriental más difuso y la corriente ecuatorial del norte y la corriente de las Antillas forman el límite sur [8].

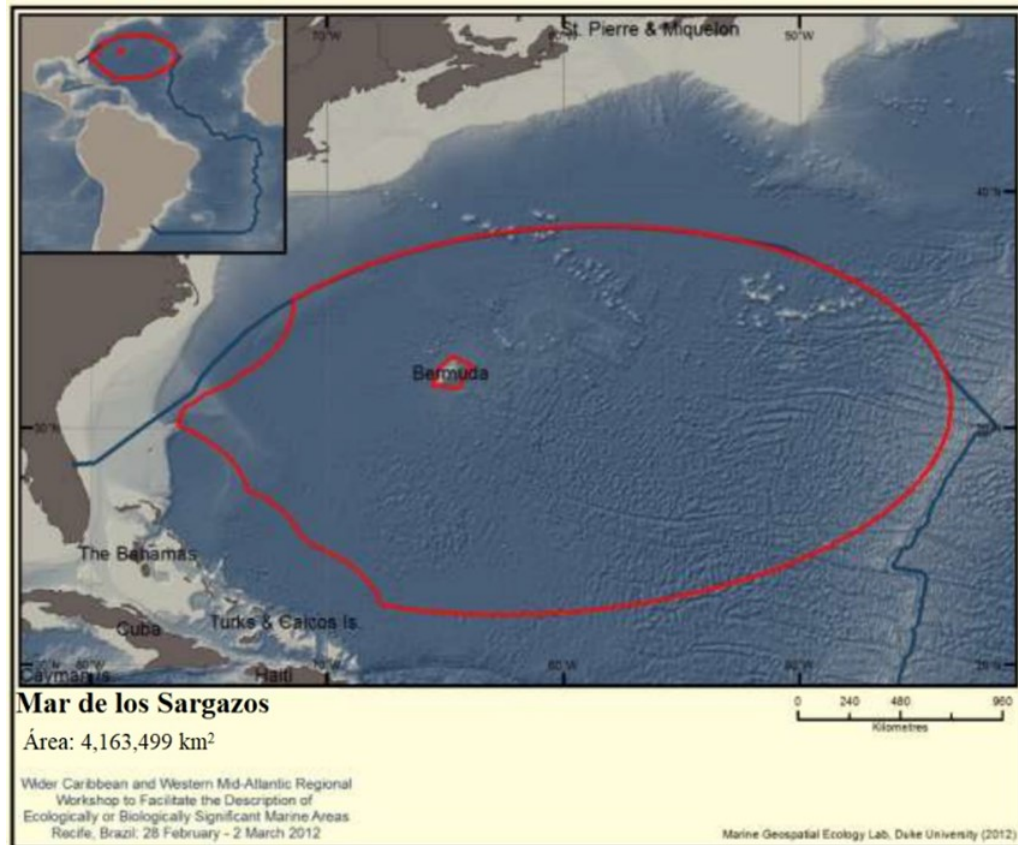


Figura 1.13: Mar de los Sargazos. De Report of the wider Caribbean and western mid-Atlantic regional workshop to facilitate the description of ecologically or biologically significant marine areas por Convention on Biological Diversity

En cuanto el arribo masivo de *Sargassum spp.* en costas mexicanas Rodríguez-Martínez *et al.*, reportan un arribo masivo desde el verano de 2014 de 2,360 m³ de sargazo por km de playa en la Costa del Caribe Mexicano [9]. La Secretaría de Medio Ambiente reportó datos que señalan que en 2015 hubo una mayor afluencia de sargazo ya que se removió un volumen de 71 353 m³ en varios municipios de la zona norte de Quintana Roo.

La afluencia masiva resultó en una acumulación del material en descomposición en las playas y aguas marrones turbias cercas de las costas (*Sargassum*-brown-tides, Sbt). La reducción de la luz, el pH y el oxígeno son algunos de los efectos provocados por el Sbt. La afluencia mensual de nitrógeno y fósforo por la deriva de *Sargassum*

spp. se estimó en 6150 y 61 kg km⁻¹ respectivamente, lo que resultó en eutrofización] [10].

I. van-Tussenbroek, *et al*, 2017, realizó una investigación sobre los efectos de las mareas marrones de sargazo (*Sargassum*-brown-tides, Sbt) en comunidades de pastos marinos (*Thalassia testudinum*, *Halodule wrightii*, *Halimeda incrassata* y algas a la deriva/epífitas) alrededor del Caribe Mexicano.

En dicho estudio concluye que los pastos marinos si se ven afectados por las Sbt, lo que causa una disminución de estos. Como se presenta en la Figura 1.14 se pueden observar los 4 diferentes pastos marinos que se estudiaron, en la parte superior antes del Sbt se nota un mayor porcentaje de área cubierta por los pastos y también una mayor cobertura de área de las costas. En la parte inferior se presenta el efecto del Sbt a los pastos marinos, los cuales disminuyeron considerablemente esto conlleva a la erosión de las costas [10].

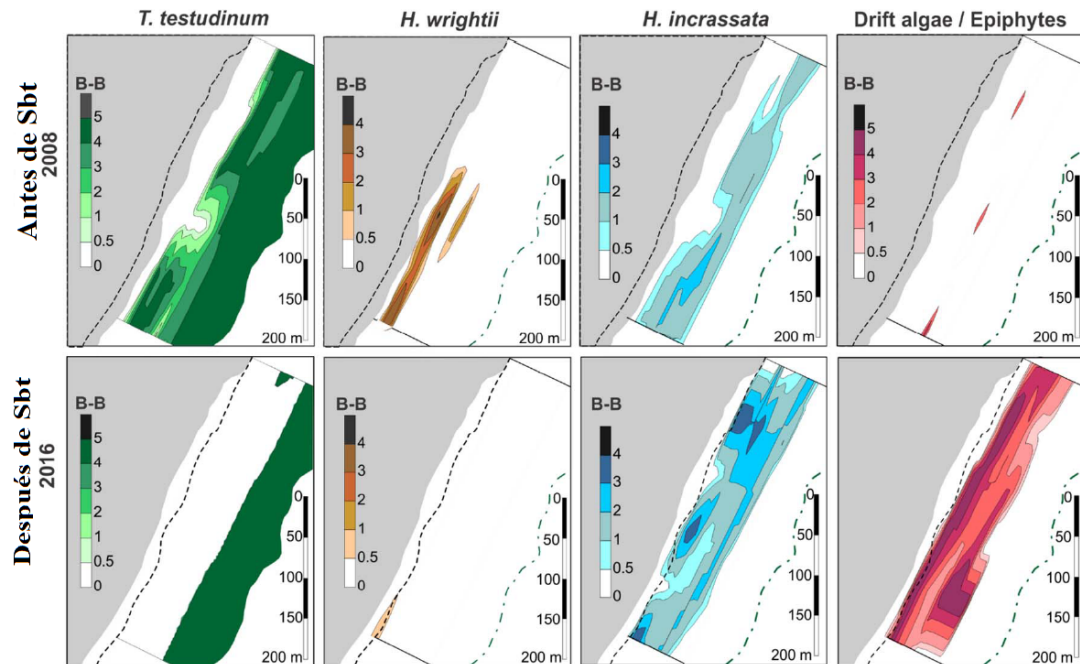


Figura 1.14: Mapas de áreas aproximadas cubiertas por los pastos marinos *Thalassia testudinum*, *Halodule wrightii*, el alga calcárea *Halimeda incrassata* y las algas de deriva/epífitas en costas del Caribe Mexicano en 2008 (antes del Sbt) y 2016 (después del Sbt). B-B: La abundancia como escala de Braun-Blanquet (B-B): 0.5 (escala r: raro y +: pocos individuos), 1 (varios individuos o cubrir hasta un 5%), 2 (muchos individuos o cubren del 6 al 26%), (cobertura del 26 al 50%), 4 (cobertura (51-75%), 5 (cubre 76-100%).

Otro efecto negativo que causa el Sbt es la mortalidad de algunas especies de corales, como lo reporta I. van-Tussenbroek, *et al*, 2017, en la Figura 1.15 se puede observar en número de colonias de corales antes (2008) y después del Sbt (2016) y la parcial mortalidad de las especies.

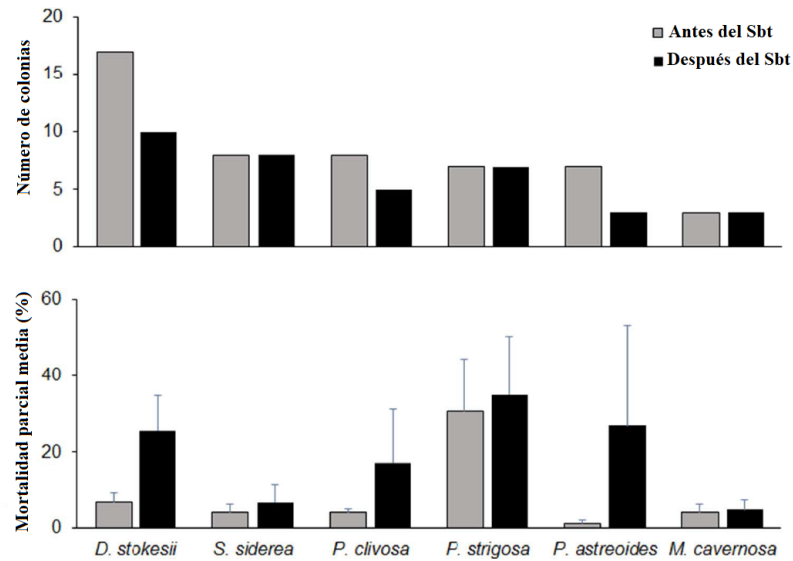


Figura 1.15: Número de colonias y mortalidad parcial media de seis especies de corales escleractinios en un sitio de monitoreo de Puerto Morelos antes (2013) y después (2016) del Sargassum-browntide (Sbt).

En la Figura 1.16 se pueden observar los efectos de las mareas marrones de sargazo (Sbt) en comunidades de pastos marinos cercanos a la costa típicas de la costa del Caribe mexicano. Antes del Sbt: una pradera de pastos marinos bien desarrollada que casi llega a la costa con aguas claras y corales saludables y otra fauna. Durante el Sbt; los lixiviados y la materia orgánica particulada de las algas marinas tiñen el agua y aumentan la materia orgánica en los sedimentos; los pastos marinos y los corales están sometidos a estrés debido a la reducción de la carga de luz y materia orgánica que causa anoxia o hipoxia y un mayor crecimiento de epífitas. Después del Sbt, se pierden pastos marinos cercanos a la costa y algunas colonias de coral. Mayor materia orgánica en los sedimentos y mayor turbidez del agua, y playas inestables o erosión de las playas debido a prácticas inadecuadas de remoción de malezas arrojadas por la playa y pérdida de praderas de pastos marinos cerca de la costa.

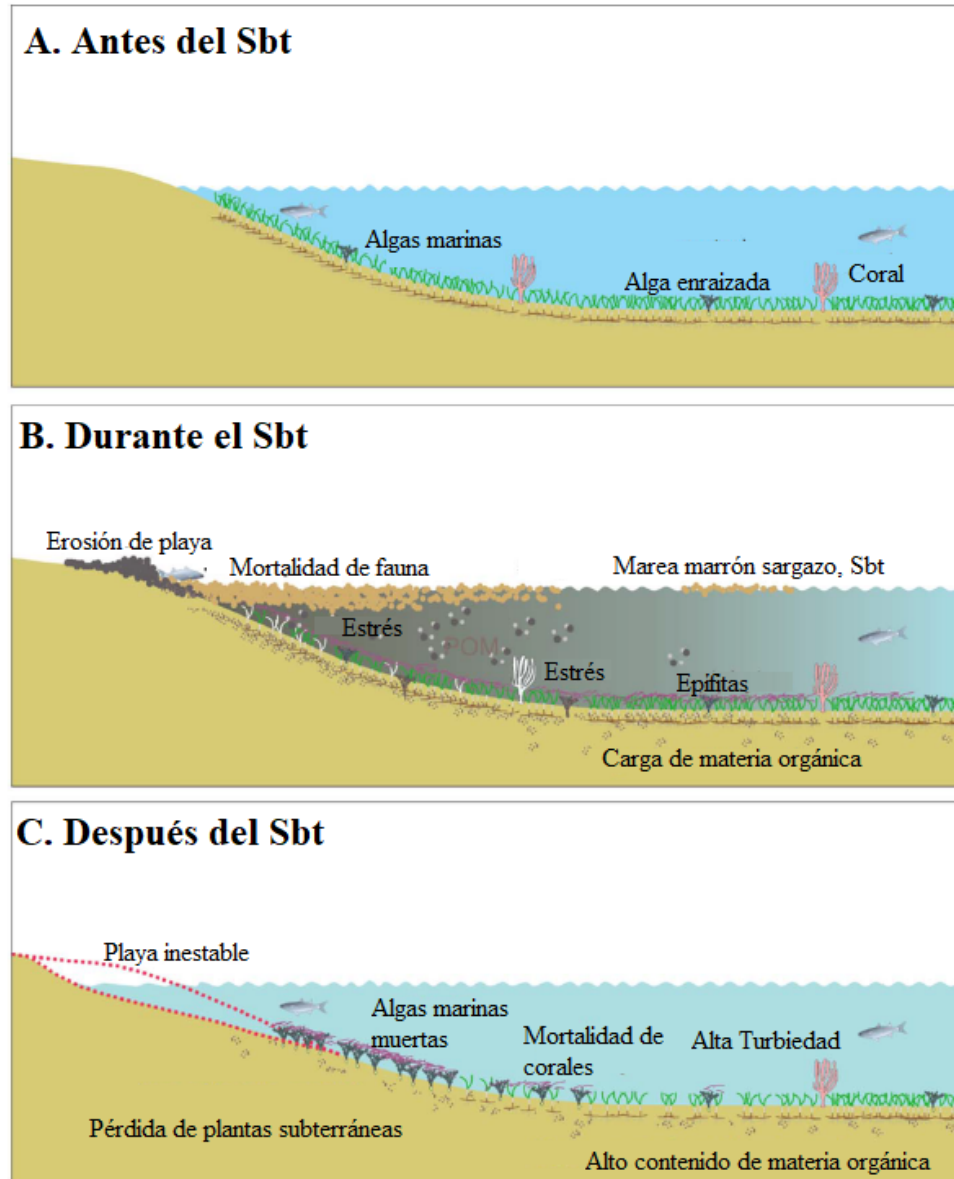


Figura 1.16: Efectos de las mareas marrones de sargazo a un ecosistema marino. De “Severe impacts of brown tides caused by *Sargassum spp.* on near-shore Caribbean seagrass communities”, por B. I. van Tussenbroek **et al.**, 2017 Mar. Pollut. Bull., vol. 122, no. 1–2, pp. 272–281.

En 2018 durante la mayor abundancia registrada del arribo de *Sargassum spp.* la mortalidad de la fauna fue afectada ya que afectó a individuos de una gran cantidad de especies, principalmente peces con hábitats neríticos demersales y crustáceos

(Figura 1.17). Se observó que la causa de la mortalidad de la fauna se debió al incremento en las concentraciones de amonio y ácido sulfhídrico.. Si la afluencia masiva de *Sargassum spp.* se convierte en un evento anual que potencialmente podría tener un impacto deletéreo en los arrecifes de coral ya degradados de la región [11].

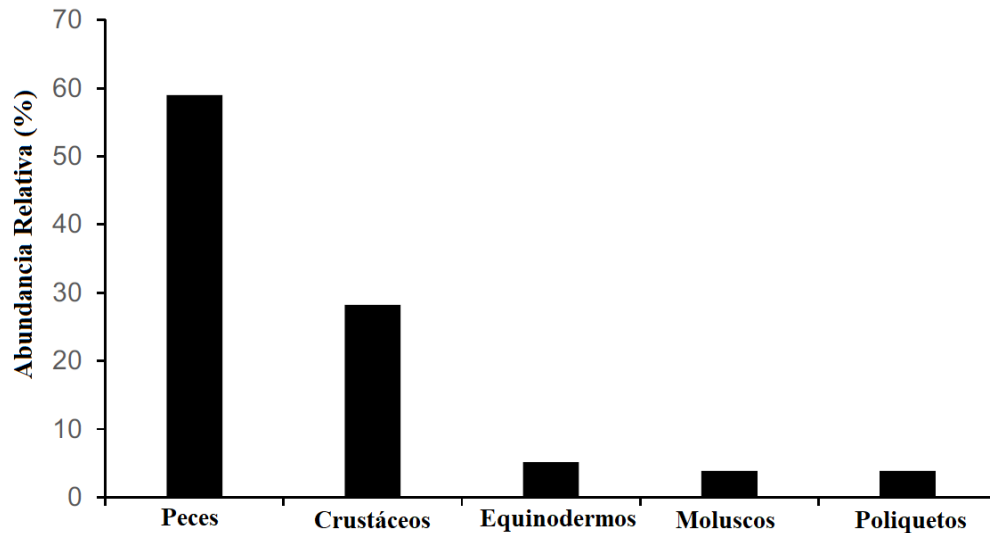


Figura 1.17: Abundancia relativa de cinco grupos de fauna observados muertos a a causa de la afluencia masiva en el Caribe Mexicano de 2018.

Debido a que el turismo es la principal actividad económica del Caribe Mexicano el aumento y descomposición del sargazo que llega a las playas afecta negativamente provocando una disminución del turismo ya que esto causa mal olor y aspecto a las playas. Además, el costo de limpieza de sargazo para la región del Caribe se estimó en \$210 millones de dólares para el año 2018 por el Mecanismo Regional de Pesca del Caribe, lo que provocó graves impactos en las economías locales y destacó la necesidad de más información sobre los eventos de varamientos masivos [12].

Cabe mencionar que la abundancia masiva del *Sargassum spp.* puede afectar la salud ya que a pesar del contenido de metales pesados del sargazo pelágico no es un problema de salud, los metaloides y el arsénico, pueden plantear un problema, especialmente si los estudios de especiación encuentran que es principalmente la forma inorgánica [13], por lo tanto, en este trabajo se presenta el uso aprovechable de

macroalgas pardas recolectadas en el Caribe Mexicano para determinar si es factible la producción de bioetanol, mediante la optimización del proceso de hidrólisis para la extracción de azúcares totales.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 BIOMASA

Antes del siglo XIX, la madera era el combustible predominante para cocinar y calentar. En los EE. UU., la chimenea de leña, el calentador y la estufa eran equipos domésticos estándar antes de principios del siglo XX [14].

Desde principios del siglo XXI, las astillas de madera se han utilizado cada vez más para calefacción y generación de electricidad [14].

La biomasa es la principal fuente de producción de bicomcombustibles, ya sea de manera directa como biomasa seca o aplicando algún proceso para la obtención de bicomcombustibles líquido como el biodiésel y bioetanol principalmente.

1.2.2 BIOETANOL

1.2.2.1 HISTORIA

El etanol se probó como combustible de motor mucho antes de la producción comercial de gasolina en 1913. En 1826 Samuel Morey diseñó un motor que utilizaba etanol y trementina lo cual hacía funcionar de 7-8 millas por hora (mph) un barco [14].

En 1860 otro motor de combustión interna fue desarrollado y esta vez fue por

Nicholaus Otto, sin embargo este funcionaba con una mezcla de combustible de etanol. El obstáculo que impidió que el etanol se utilizara como combustible para motores en los EE. UU. Fue el impuesto al alcohol promulgado en la década de 1860 para financiar la Guerra Civil [14].

Más tarde, el industrial estadounidense Henry Ford construyó tractores que podían funcionar con etanol. En 1925, Ford había citado el alcohol etílico, etanol, como «el combustible del futuro». Además, declaró: “El combustible del futuro vendrá de las manzanas, las malezas, el aserrín casi cualquier cosa. Hay combustible en cada trozo de materia vegetal que puede ser fermentado” [15].

La crisis del petróleo de 1973 provocó un resurgimiento del interés en el etanol como combustible. Se realizaron importantes esfuerzos de investigación para desarrollar la conversión biotécnica de biomasa vegetal a etanol [14]. En 1975 el gobierno brasileño implementó una estrategia, la cual fue evitar una desaceleración en el consumo de energía para que el crecimiento económico se mantuviera constante, por ello, el objetivo era sustituir el petróleo importado por fuentes nacionales lo más rápido posible. Por lo cual, se creó el Programa Nacional del Alcohol, conocido comúnmente como «Proálcool» cuyo principal objetivo fue la sustitución de la gasolina por etanol obtenido a partir de biomasa de caña de azúcar [16].

1.2.2.2 ESTUDIOS DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE TERCERA GENERACIÓN

La producción de biocombustibles de segunda y tercera generación en los últimos años se han investigado más, debido a que estos no afectan la existencia de los alimentos como lo hacen los de primera generación. Los estudios se centran en optimizar el proceso de producción para tener altos rendimientos de los combustibles producidos.

En 2013, Cho *et al.*, desarrollaron un estudio en el que evaluaron como la

alta concentración de sal afecta la producción de bioetanol. El alga que evaluaron fue *Undaria pinnatifida* y adaptaron la levadura *P. angophorae* KCTC 17574. En el estudio determinaron con el método de superficie de respuesta (siglas en inglés RSM) las condiciones óptimas para la hidrólisis térmica ácida fueron a 75 mM de H_2SO_4 en 13 % (p/v) de materia prima a 121 °C durante 60 minutos. Obteniendo un alto contenido de monosacáridos igual a 28.42 g/L con un 42 % del rendimiento teórico [17].

En cuanto a la adaptación de las levaduras en un medio salino se obtuvo que la tolerancia de sal fue de 90 psu, con una concentración de etanol igual a 9.42 g/L, con un rendimiento teórico del 27 %.

Shih-Hsin Ho, *et al.*, 2013, realizaron un estudio que tuvo como objetivo evaluar el potencial del uso de microalga rica en carbohidratos *Chlorella vulgaris* FSP-E como materia prima para la producción de bioetanol a través de diversas estrategias de hidrólisis y procesos de fermentación [18].

La hidrólisis enzimática de la biomasa de *Chlorella vulgaris* FSP-E dio un rendimiento de glucosa de 90.4 % (0.461 g/g biomass). Los procesos hidrólisis y fermentación separada (SHF por sus siglas en inglés) y sacarificación y fermentación simultánea (SSF por sus siglas en inglés) convirtieron el hidrolizado enzimático de microalgas en etanol con un rendimiento teórico de 79.9 % y 92.3 %, respectivamente.

La hidrólisis ácida diluida con ácido sulfúrico al 1 % también fue muy efectiva en la sacarificación de la biomasa de *Chlorella vulgaris* FSP-E, logrando un rendimiento de glucosa de casi el 93.6 % de los carbohidratos de microalgas a una concentración de biomasa de 50 g/L.

Utilizando el hidrolizado ácido de la biomasa de *Chlorella vulgaris* FSP-E como materia prima, el proceso SHF produjo etanol a una concentración de 11,7 g/L y un rendimiento teórico del 87,6 %. Estos hallazgos indicaron la viabilidad del uso de microalgas productoras de carbohidratos como materia prima para la producción de bioetanol fermentativo.

Mutripah, *et al.*, 2014, realizaron un estudio en el cual se evaluaron 20 especies de algas rojas como recursos para la producción de bioetanol. El candidato más prometedor resultó ser la *Palmaria Palmata*. De igual manera, se determinaron los parámetros óptimos para el proceso de producción, resultando lo siguiente: en la hidrólisis ácida, utilizaron H_2SO_4 a 0.2 M a 121 °C a 3000 rpm durante 25 minutos. Para la fermentación utilizaron *S. Cerevisiae* por 72 horas a 30 °C a 130 rpm [19].

La *P. palmata* obtuvo un alto contenido en carbohidratos, ART, glucosa y galactosa después de la hidrólisis. Obteniendo un alto rendimiento de etanol de 12.9 mg de etanol/g de alga marina. Además, de que se adquirieron bajos niveles de subproductos como el ácido levulínico y 5-Hidroximetifurfural (HMF).

De igual manera, en 2014, Siew-Ling, *et al.*, realizó un estudio en el cual se aplicaron técnicas de optimización estadística para extraer azúcar fermentable (AF) del alga parda autóctona, *Sargassum binderi*. La extracción de AF de *S. binderi* se optimizó aún más con el diseño compuesto central (CCD) mediante el uso de la metodología de superficie de respuesta (por sus siglas en inglés RSM) [20].

El modelo propuesto en este estudio se ajusta significativamente bien a los datos experimentales con más del 95 % de confianza. La condición óptima propuesta por el modelo cúbico para el rendimiento máximo de AF se encontró de la siguiente manera: pretratamiento de *S. binderi* con 6.38 % de H_2SO_4 diluido a 120.7 °C, seguido de hidrólisis usando 0.16 mL de carga de celulasa por unidad de gramo de pretratado seco algas marinas.

Los resultados de los experimentos de validación dieron un rendimiento de AF de 1,69 g g⁻¹ que encajó bien con el valor predicho por RSM (1,72 g g⁻¹). El error general fue pequeño, lo que indica la competencia de los modelos para optimizar la extracción de AF de *S. binderi*. El presente estudio indicó que el alga parda *S. binderi* tiene potencial para convertirse en una fuente confiable de biomasa para la producción de productos de valor agregado.

Por otro lado, Sunwoo, *et al.*, 2017, realizó un estudio en el cual evaluó la

producción de etanol a partir de algas residuales rojas, pardas y verdes. En este estudio se realizó pretratamiento con las condiciones óptimas siguientes: 286 mM de H_2SO_4 por 90 minutos a 121 °C. Asimismo, se realizó una sacarificación enzimática con una mezcla de 16 unidades/mL de Celluclast 1.5L y Viscozyme L a 45 °C durante 48 horas. Como resultado se obtuvo una concentración de monosacáridos de 30.2 g/L para la producción de etanol [21].

En la fermentación usaron las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1126 and *Pichia angophorae* KCTC 17574 para galactosa y manitol, respectivamente. Esta fue llevada a cabo a 30 °C a 150 rpm durante 144 horas. La máxima concentración de etanol de 13.5 g/L fue obtenida con un YEtOH de 0.45 usando las dos levaduras antes mencionadas.

En 2019 Hessami, *et al.*, evaluaron el proceso óptimo de producción el alga roja *Gelidium elegans* con el método RSM. Las variables independientes fueron temperatura, concentración del ácido, y tiempo de incubación, dado que estas se presentan como factores cinéticos de la hidrólisis térmica [22].

Las condiciones óptimas fueron las siguientes: Temperatura igual a 120 °C, concentración de ácido sulfúrico al 2.5 % (p/v) durante 40 minutos.

La galactosa y la glucosa fueron azúcares reductores dominantes en el hidrolizado de *G. elegans* y en condiciones óptimas de hidrólisis ácida diluida, se produjo un 39,42 % de azúcares reductores y la fermentación dio como resultado una concentración de etanol de $13,27 \pm 0,47$ g/L.

Además, Alfonsín, *et al.*, 2019, estudió la producción de bioetanol de tercera generación a partir de residuos de macroalgas de la extracción industrial de agar. La biomasa estudiada fue *Eucheuma Denticulatum Spinosum* y realizaron una optimización de la hidrólisis ácida teniendo como variables independientes el tiempo (35, 70, 105min), la ratio (7:1, 10:1, 13:1 v/p) y concentración de ácido sulfúrico (3, 5, 7, 9%). Manejaron una temperatura estable de 121 °C en una autoclave [23].

Los resultados indicaron que la capacidad de hidrólisis general es función de la acción combinada de la concentración de ácido, la temperatura y el tiempo de reacción. Las concentraciones de ácido más altas dieron como resultado en general tasas de hidrólisis más altas. El mayor rendimiento de azúcares reductores se obtuvo a los 70 min, a una concentración de ácido del 9% en peso. y proporción de 7. Los hidrolizados se convirtieron en bioetanol usando *S. Cerevisiae* con un rendimiento de 11,6 g / g y una eficiencia del 75%.

Otro estudio realizado en 2019 por Zeng, *et al.*, evaluaron la viabilidad de utilizar *Sargassum horneri* como materia prima para producir bioetanol. Durante la producción de bioetanol, se utilizó S-SSF (sacarificación y fermentación semisimultáneas) utilizando levaduras *P. stipites* inmovilizadas con alginato de calcio a partir de *S. horneri* pretratado con ácido [24].

Además, los efectos del tiempo de prehidrólisis, la carga de celulasa, la temperatura de fermentación y el tiempo de fermentación sobre la concentración y el rendimiento de bioetanol se evaluaron mediante el uso de la metodología de superficie de respuesta. Las condiciones operativas o variables dependientes fueron tiempo de prehidrólisis (40, 50, 60 min); Tiempo de SSF (5, 10, 15 h); y temperatura de SSF (25, 30, 35 °C) y la variable dependiente estudiada fue la concentración de etanol (EC en g/L).

Como resultado obtuvieron una concentración máxima de bioetanol (2,89 g/L) y un rendimiento máximo de bioetanol (0,11 g/g de materia prima) con carga de celulasa (10 UI/g de materia prima), tiempo de prehidrólisis (53 min), temperatura de SSF (32 ° C) y el tiempo de SSF (14 h).

1.3 HIPÓTESIS

Es factible determinar los parámetros y condiciones adecuadas, principalmente la concentración de reactivo, tiempo de reacción y agitación de la etapa de hidrólisis

ácida con el fin de obtener un alto rendimiento de azúcares totales respecto a las algas pardas (g alga/g azúcares totales) y, consecuentemente producir bioetanol a nivel laboratorio,

1.4 OBJETIVO GENERAL

Optimizar los parámetros de hidrólisis ácida para la obtención de azúcares totales a partir de algas pardas (*Sargassum spp.*).

1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los parámetros y condiciones adecuadas, tales como velocidades de agitación y tiempos de reacción, concentración del reactivo para la obtención de azúcares totales.
- Optimizar la etapa de hidrólisis ácida mediante el método de superficie de respuesta
- Determinar las variables del proceso de producción para optimizar.
- Determinar los parámetros y condiciones de las variables a optimizar.
- Determinar el punto óptimo de los parámetros estudiados en la etapa de hidrólisis ácida
- Analizar los azúcares reductores totales mediante el Método Fenol-sulfúrico
- Analizar la obtención de bioetanol mediante cromatografía de gases.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

El este capítulo se presentará el marco teórico en el cual se destacan las bases teóricas que ayudaron al desarrollo de este trabajo. Primero se explica sobre la materia prima que se utilizará, así como su composición fisicoquímica, los diferentes tipos de biocombustibles, sobre todo los de tercera generación. Por último se explica sobre los procesos de producción de bioetanol

2.1 BIOMASA

La biomasa es el resultado de la fijación fotosintética de carbono por las plantas para formar polímeros orgánicos que pueden ser digeridos enzimática o químicamente a monómeros de carbohidratos, proteínas y lípidos [25] Los bosques representan el 70-90 \ % de la biomasa terrestre, la mayor parte de esta biomasa en árboles [26].

2.1.1 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

La lignocelulosa es un término genérico que se utiliza para describir la biomasa vegetal. Es el recurso de carbono renovable más abundante del mundo y está compuesto principalmente por lignina, celulosa y hemicelulosas. La mayoría de los desechos de la industria alimentaria y de procesamiento de alimentos son de naturaleza lignocelulósica con una estimación global de hasta 1.300 millones de toneladas / año. La biomasa está compuesta de celulosa (40–50 \ %), hemicelulosa (25–35 \ %) y lignina (15–20 \ %) [24] como se puede apreciar en la 2.1.

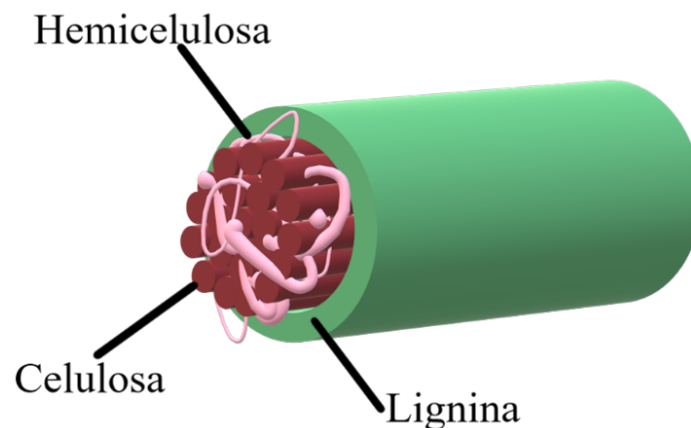


Figura 2.1: Estructura de la biomasa lignocelulósica..

La materia lignocelulósica se utiliza principalmente para la elaboración de productos energéticos mediante tratamiento, físicos, térmicos, químicos y biológicos.

Esto con el fin de sustituir los energéticos fósiles, ya que tienen la ventaja de ser una fuente renovable y su emisión de CO_2 es menor a los combustibles fósiles. Sin embargo, tienen como desventaja que los tratamientos pueden ser costosos.

2.1.2 CELULOSA

La celulosa está compuesta de unidades de glucosa unidades D-glucosa ligadas por un enlace glucosídico β -1,4 que podrían hidrolizarse mediante celulasas, lo que da como resultado azúcar fermentable para la bioconversión del bioetanol [27]. Su fórmula empírica es $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ y su peso molecular es variable.

La celulosa es el principal componente de las paredes celulares del material vegetal y llega a ser muy difícil de degradar por los animales y humanos. Por lo que se han investigado formas en las que pueden ser usadas, como son para la obtención de energías como bioetanol, biodiesel y biogás. Sin embargo, producir azúcares monoméricos a partir de celulosa y hemicelulosa con altos rendimientos es mucho más difícil que extraer azúcares de cultivos que contienen azúcar o almidón, por ejemplo, caña de azúcar o maíz [15].

Para la producción de energéticos de segunda y tercera generación como el bioetanol se requiere principalmente material lignocelulósico, sin embargo, el componente primordial es la glucosa, para la obtención de esta se requiere de la conversión de celulosa a azúcares mediante tratamientos químicos, biológicos, térmicos y físicos.

2.1.3 HEMICELULOSA

Son polímeros ramificados de pentosas, hexosas y azúcares acetilados [25]. Químicamente son heterogéneos. Estas relativamente son fáciles de hidrolizar por los ácidos, a sus componentes monoméricos que consisten en glucosa, manosa, galac-

tosa, xilosa, arabinosa y pequeñas cantidades de ramnosa, ácido glucurónico, ácido metilglucurónico y ácido galacturónico [28].

La desventaja de la degradación de la hemicelulosa es que esta da como resultado furfurales e hidroximetilfurfural (HMF) los cuales inhiben la fermentación para la obtención de bioetanol. Sunwoo, et al., 2017, reporta que a los 90 y 120 minutos de reacción de tratamiento, la producción de 5-HMF aumentó de 2,4 a 6,5 g/L.

2.1.4 LIGNINA

Está compuesta de unidades fenilpropenilo (C9) ramificadas al azar. Los componentes básicos del fenilpropenilo, como los guayacoles y los siringoles, están conectados a través de enlaces carbono-carbono y carbono-oxígeno (éter). Es un polímero tridimensional altamente complejo de diferentes unidades de fenilpropano unidas por enlaces éter (C - O) y carbono-carbono (C - C) (Figura 2.2). La lignina se concentra entre las capas externas de las fibras, lo que genera rigidez estructural y mantiene unidas las fibras de polisacáridos (15-30%). Está compuesta de unidades fenilpropenilo (C9) ramificadas al azar. Los componentes básicos del fenilpropenilo, como los guayacoles y los siringoles, están conectados a través de enlaces carbono-carbono y carbono-oxígeno (éter). Además, es la fuente renovable más abundante que tiene unidades aromáticas en su estructura [28].

La lignina también se ha implicado como inhibidor de las celulasas; por lo tanto, muchos de los métodos de pretratamiento que se están explorando actualmente han intentado disminuir el contenido de lignina del sustrato sólido mientras se minimiza la degradación de los carbohidratos [citado de [25]]. La lignina une la pectina, la proteína y los dos tipos de polisacáridos, celulosa y hemicelulosa, en la biomasa lignocelulósica. La lignina resiste el ataque microbiano y agrega fuerza a la planta. Por lo tanto, los pretratamientos aplicados se utilizan para abrir la biomasa degradando la estructura lignocelulósica y liberando los polisacáridos [15]. Los tratamientos

que reducen el contenido de lignina del sustrato incluyen el organosolv pulping¹ con varios disolventes, incluidos etanol, glicerol y etilenglicol.

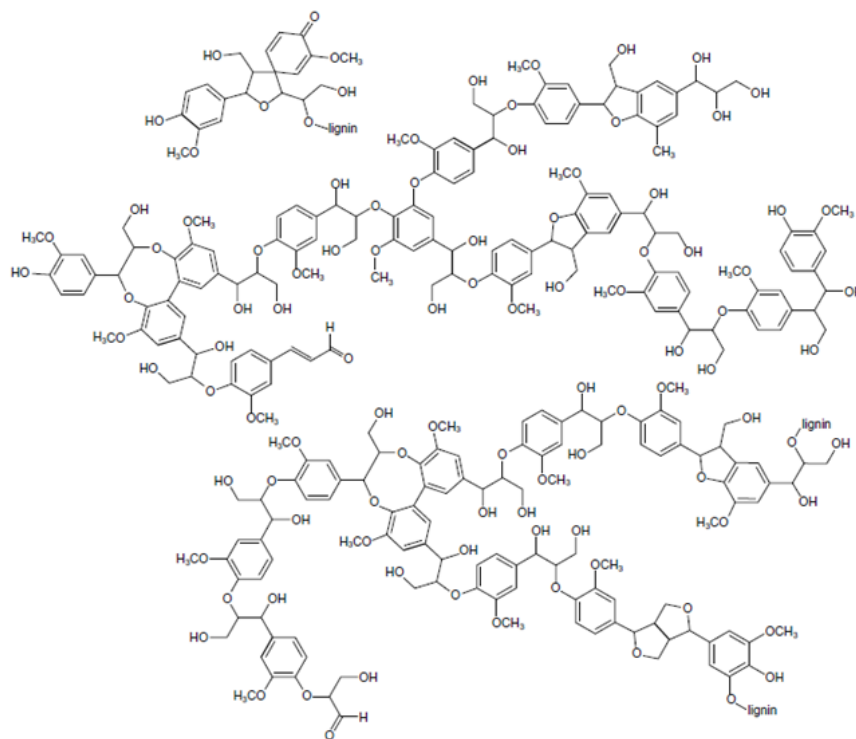


Figura 2.2: Estructura de la lignina de madera suave. De cap. General, por Ashok Pandey, et al. Biofuels. Alternative feedstocks and conversion processes, 10, 2011, Academic Press.

A continuación, se presenta una estructura química de un compuesto lignocelulósico, conformada de lignina, celulosa y hemicelulosa.

¹ El organosolv pulping es una de las extracciones eficientes de lignina de maderas duras con mayor recuperación de lignina del 60 %, menor cantidad de cenizas y residuos de carbonato, así como preservación de la estructura original a través del enlace -O-4.

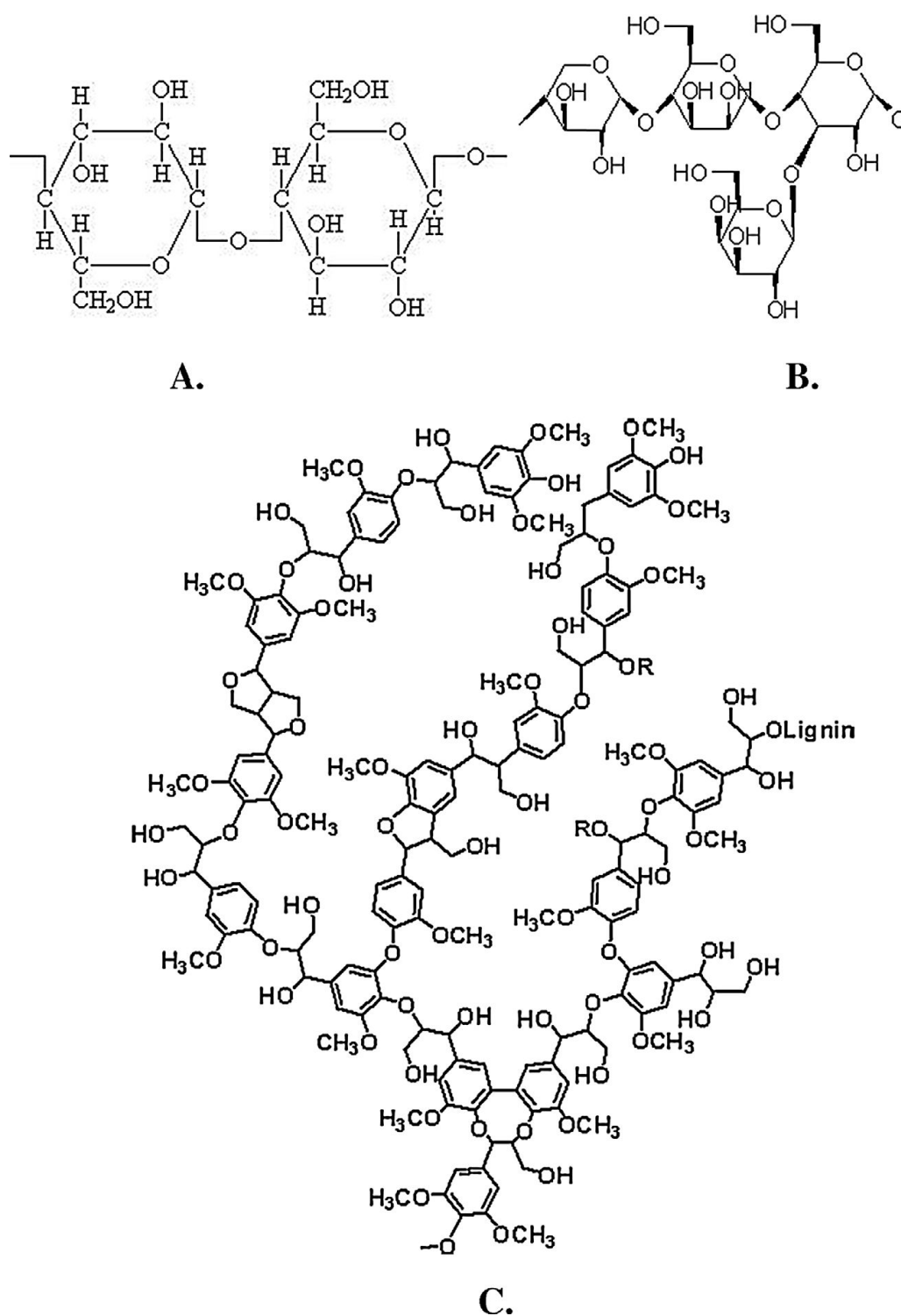


Figura 2.3: a) Estructura de la celulosa (compuesta por uniones de D-glucosa unidas por enlaces β -1, 4 glucósidos). b) Estructura de la hemicelulosa. c) Estructura de la lignina. Advances in Genetic Manipulation of Lignocellulose to Reduce Biomass Recalcitrance and Enhance Biofuel Production in Bioenergy Crops, M. Madadi *et al.*, 5, 2017, Journal of Plant Biochemistry Physiology. DOI: 10.4172/2329-9029.1000182

2.2 BIOCOMBUSTIBLES

Son los combustibles producidos a partir de una fuente renovable principalmente de biomasa de cultivos como, el arroz, maíz, sorgo, azúcar (primera generación). También se pueden obtener de residuos de cultivos como la melaza de caña, cascaras de maíz y arroz, de desechos lignocelulósicos de maderas suaves y duras (segunda generación). Las algas también son una fuente para la producción de biocombustibles (tercera generación). De todos los biocombustibles, se ha confiado en el etanol como combustible alternativo para el futuro y ya se produce en una escala justa en todo el mundo [15].

La principal razón del interés por los biocombustibles renovables es la posibilidad de obtener una reducción sustancial de las emisiones de escape nocivas de la combustión, especialmente a medida que los límites legales son cada vez más estrictos y se regulan más componentes de escape [15].

Las preocupaciones sobre los balances energéticos están relacionadas tanto con la eficiencia energética del ciclo de vida de los biocombustibles como con el ahorro de energía no renovable entre los biocombustibles y los combustibles fósiles. Este último aspecto es relevante con respecto a la eficiencia de sustitución de los biocombustibles [28].

2.2.1 BIOCOMBUSTIBLES DE PRIMERA GENERACIÓN

Los biocombustibles de primera generación se obtienen a partir de biomasa comestible como caña de azúcar, maíz, trigo, cereales, oleaginosas, aceites vegetales y grasas animales extraídas. Los bioalcoholes de primera generación (bioetanol) se producen mediante la fermentación de levadura de azúcares vegetales y almidones obtenidos de cultivos como la caña de azúcar, la remolacha azucarera y el maíz. Sin embargo, el éxito futuro de los biocombustibles de primera generación está limitado

por su insostenibilidad social y ambiental [29].

Los biocombustibles de "primera generación" pueden ofrecer algunos beneficios de CO₂ y pueden ayudar a mejorar la seguridad energética nacional. Pero existen preocupaciones sobre el abastecimiento de materias primas, incluido el impacto que puede tener sobre la biodiversidad y el uso de la tierra y la competencia con los cultivos alimentarios. Un biocombustible de 'primera generación' se caracteriza por su capacidad para mezclarse con combustibles derivados del petróleo, quemarse en motores de combustión interna existentes y distribuirse a través de la infraestructura existente, o por el uso en tecnología de vehículos alternativos existente como FFV ("Vehículo de combustible flexible") o vehículos de gas natural [30].

2.2.2 BIOCMBUSTIBLES DE SEGUNDA GENERACIÓN

Los biocombustibles de segunda generación son producidos a partir de material vegetal no comestible, tal como desechos lignocelulósicos. La biomasa lignocelulósica es el material vegetal más abundante en el planeta y está disponible en cantidades mucho más altas debido a mayores rendimientos por área de tierra, y a un costo menor que los materiales a base de almidón y sacarosa [29], además de que estos reducen la competencia con los la materiales comestibles usados para dicha producción. Sin embargo, existe preocupación sobre el uso de la tierra en competencia o los cambios de uso de la tierra requeridos [31].

No obstante, la tecnología para la producción de estos biocombustibles no está completamente desarrolladas ya que a diferencia de los de primera generación estos necesitan de un tratamiento adicional para la obtención de los azúcares en el caso de producción de bioetanol.

2.2.3 BIOCOMBUSTIBLES DE TERCERA GENERACIÓN

Son los biocombustibles basados en materia de algas (microalgas y macroalgas) y cianobacterias, que producen carbohidratos, proteínas, aceites vegetales (lípidos) y, posteriormente, biodiésel e hidrógeno gaseoso, por lo que están ganando un interés considerable [29]. Además, el cultivo de microalgas crea un sumidero de gases de efecto invernadero, lo que lo hace más verde por naturaleza [32].

De acuerdo con R. Singh, *et al.*, 2015, las algas son consideradas como materia prima potencial para la producción de biocombustibles son los siguientes:

- Alta productividad por unidad de área,
- Recursos de materias primas no basadas en alimentos,
- Uso de tierras no productivas y no cultivables,
- Utilización de una amplia variedad de fuentes de agua (dulce, salobre, salina, marina, producidos y aguas residuales),
- Producción de biocombustibles y coproductos valiosos, y
- Reciclaje potencial de CO₂ y otras corrientes de desechos de nutrientes

Sin embargo, la producción de biocombustible a partir de materia prima de microalgas sigue siendo cuestionable, ya que es necesario un aporte intensivo de energía como resultado de la suplementación de nutrientes, los procesos posteriores involucrados, etc. En la actualidad, la comercialización de biocombustible a base de microalgas todavía está en marcha para optimizar aún más los sistemas de cultivo disponibles, como los estanques y fotobiorreactores cerrados de manera rentable para la producción de biocombustibles [32].

La composición de la materia seca de las algas se puede ajustar en función de las especies de algas y el procedimiento de crecimiento. Las microalgas exhiben

una gran variabilidad en el contenido de lípidos. Entre las especies de microalgas, en las cuales el contenido de aceite puede alcanzar hasta el 80 %, son el *Botryococcus*, y niveles del 20 al 50 % son bastante comunes en las especies de *Chlorella*. Las variaciones se deben a diferentes condiciones de cultivo y métodos de extracción de lípidos y ácidos grasos. Además, se sabe que microalgas como *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydo monas*, *Scenedesmus* y *Spirulina* contienen una gran cantidad de almidón y glucógeno (> 50 % del peso seco) que pueden utilizarse como materias primas para la producción de etanol. Las microalgas también pueden asimilar la celulosa que también se puede fermentar a bioetanol [33]. Las microalgas tienen dimensiones microscópicas, mientras que las macroalgas o algas marinas, son mucho más grandes. A diferencia de las algas las cianobacterias son bacterias que realizan exactamente el mismo tipo de fotosíntesis que las algas verdes, pero son más primitivas. Las algas y las cianobacterias utilizan dióxido de carbono atmosférico, agua y luz solar para fotosintetizar su biomasa [34].

Las algas pardas (*Phaeophyta*) en particular contienen polisacáridos de almacenamiento que son sustratos para la degradación microbiana. Contienen altas cantidades de carbohidratos como ácido algínico (estructural) y laminaran y manitol (almacenamiento) que potencialmente pueden fermentarse en etanol. El alginato típicamente constituye el 30-40 % del peso seco en las algas marrones gigantes (algas marinas). La laminarina es un polisacárido lineal de 1,3-β-Dglucopiranososa y puede hidrolizarse con relativa facilidad a glucosa fermentable. A diferencia de la biomasa lignocelulósica, tienen bajos niveles de lignina y celulosa, lo que las hace más susceptibles de bioconversión a combustibles energéticos que las plantas terrestres [15].

2.2.3.1 ALGAS

Son organismos acuáticos capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica por lo que realizan una gran aportación de oxígeno al planeta, desde hace varios años las

algas han sido objeto de estudios ya que han mostrado un gran potencial como fuente para la producción de biocombustibles debido a su alto contenido de ácidos grasos y a su rápida producción de biomasa.

Las algas utilizan la fotosíntesis para convertir la energía solar en energía química. Almacenan esta energía en forma de aceites, carbohidratos y proteínas. Cuanto más eficiente sea una planta en particular para convertir esa energía solar en energía química, mejor será desde la perspectiva del biodiésel, y las algas se encuentran entre las plantas fotosintéticamente eficientes del planeta. Una granja de algas de 1 ha en un terreno baldío puede producir de 10 a 100 veces más aceite en comparación con cualquier otra fuente conocida de cultivo de aceite. Las emisiones de gases de efecto invernadero producidas por la industria podrían disminuir mediante las tecnologías basadas en algas. [34]. De estos organismos fotosintéticos podemos encontrar a las microalgas y macroalgas.

2.2.3.2 MICROALGAS

Las microalgas (fitoplancton) son un conjunto diverso de formas vegetales, predominantemente acuáticas, unicelulares, multicelulares o coloniales [35]. Estas son clasificadas de acuerdo con su ciclo de vida, pigmentación y estructura celular. Los sistemas de microalgas de segunda generación tienen la ventaja de que pueden producir una amplia gama de materias primas para la producción de biodiésel, bioetanol, biometano y biohidrógeno [36].

Las microalgas son la forma más primitiva de plantas. Si bien el mecanismo de fotosíntesis en las microalgas es similar al de las plantas superiores, generalmente son convertidores de energía solar más eficientes debido a su estructura celular simple [36] (Figura 2.5).

La biomasa de las microalgas está compuesta principalmente de carbohidratos, proteínas y lípidos, lo que hace posible la producción de combustibles como bioetanol

y biodiesel. Debido a que su reproducción y crecimiento se debe a la absorción de energía solar y CO_2 se consideran una materia prima potencial para la producción de biocombustibles, los cuales al ser de una fuente renovable sus emisiones de CO_2 son menores a las de los combustibles fósiles.

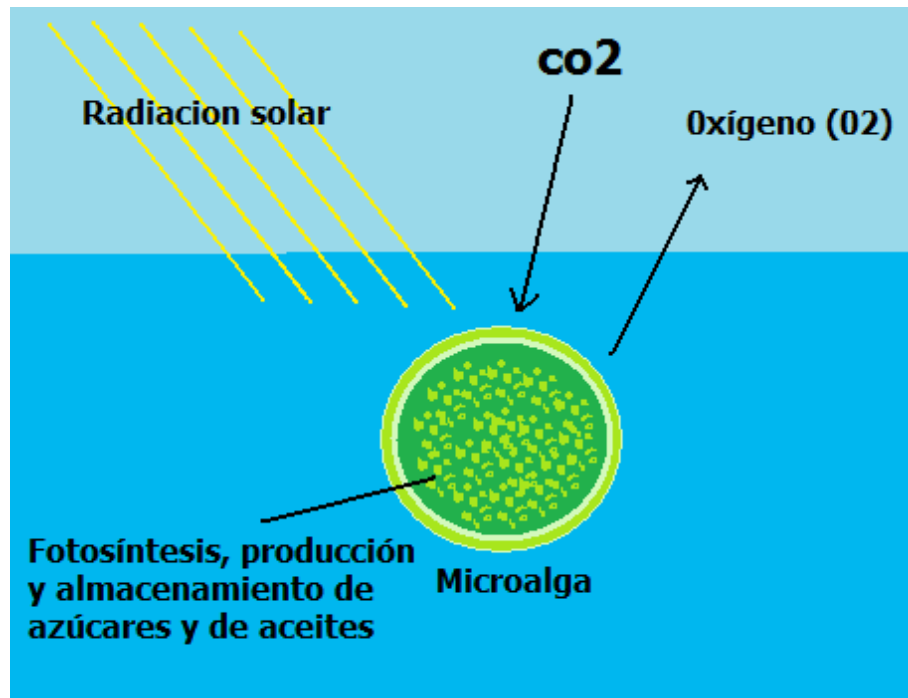


Figura 2.4: Proceso fotosintético de las microalgas.
<https://www.eoi.es/blogs/merme/microalgas-y-biocombustibles/>

2.2.3.3 MACROALGAS

Las macroalgas o algas marinas son plantas multicelulares que crecen en agua salada o dulce [36]. De acuerdo con McHugh, D. J., 2003, las algas marinas pueden clasificarse en tres grupos basados en su pigmentación: pardas (*Phaeophyceae*), roja (*Rhodophyceae*) y verdes (*Chlorophyceae*) [37]. Las algas rojas generalmente son de 1 m de largo, algunas suelen ser de color púrpura. Las algas verdes son pequeñas de tamaños similares a las algas rojas. Las algas pardas son usualmente grandes que van desde los 20 m de largos, las gruesas de 2 a 4 m y las especies más pequeñas de

30 a 60 cm.

Las algas pardas tienen una gran variedad de usos, de estas se pueden producir y extraer productos como hidrocoloides alginatos, agares, fertilizantes y aditivos. Algunas algas pardas tienen uso alimenticio, principalmente en países asiáticos como China y Japón. Su color marrón se debe a la presencia de pigmentos de xantofilas y fucoxantina. Estos pigmentos actúan como una máscara para otros pigmentos. La pared celular está formada por celulosa y ácido algínico [38].

2.2.3.4 USO DE LAS ALGAS MARINAS COMO COMBUSTIBLES

En estudios previos se ha investigado sobre la aplicación de las macroalgas para la producción de biocombustibles por lo que se determinó que son prominentes para la producción de energías debido a su alto contenido de carbohidratos, proteínas, alginatos, entre otros, por lo que es posible aprovecharlas para la producción de biometano, biohidrógeno, bioetanol. Los principales grupos de carbohidratos que se encuentran en las algas marinas son laminaria, alginato, celulosa, fucoidan y el alcohol de azúcar manitol [39]. Sin embargo, una de las etapas limitantes del proceso biológico es la conversión de carbohidratos poliméricos en azúcares monoméricos [40].

Las algas ricas en carbohidratos y de rápido crecimiento, como la especie *S. japonica*, se están convirtiendo cada vez más en la biomasa de elección de tercera generación. Los procesos respetuosos con el medio ambiente y económicamente racionales para la producción de biocombustibles son esenciales si se quieren aprovechar los beneficios de estas nuevas materias primas marinas [41].

En literatura revisada se encontraron estudios que demuestran que las algas pardas pueden ser usadas para la producción de biocombustibles, como lo son la *Saccharina latissima* [39] [40] y *Saccharina japónica* [41]. Este estudio su objetivo fue evaluar el potencial del *Sargassum spp.*, por lo que se especifica más a detalle las

características de esta alga.

2.3 BIOETANOL

El bioetanol es un biocombustible líquido que se produce mediante la fermentación ABE (fermentación. Acetona-butanol-etanol) de diferentes tipos de materias primas renovables, como maíz, soja, paja de trigo, astillas de madera y, más recientemente, microalgas [38] y macroalgas. El bioetanol es un alcohol, grupo de compuestos químicos cuyas moléculas contienen un grupo hidroxilo (-OH), unido a un átomo de carbono [15]. Su fórmula química es C_2H_5OH o cómo se puede observar a continuación:

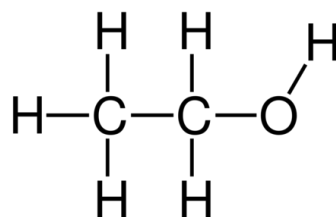


Figura 2.5: Estructura molecular del bioetanol.
<https://cremeroleo.de/en/products/bioethanol.html>

A continuación, en la Tabla 2.1 se pueden observar las propiedades fisicoquímicas del bioetanol.

Tabla 2.1: Propiedades fisicoquímicas del bioetanol.

Propiedades del combustible	Bioetanol
Densidad 15 °C	790 kg/m ³
Viscosidad cinemática 40 °C	1.130 mm ² /s
Número de cetano	5 - 8
Oxígeno	34.7% masa
Número de octanaje	110
Calor latente de vaporización	921 kJ/g
Valor calorífico	25.22 - 26.70
Flash point	13 C
Temperatura de auto-ignición	332.8 - 336.0 °C
Contenido de agua	2024 mg/kg
Radio estequiométrico combustible/aire	1/9.01
De L. S. Khuong et al., 2016.	

De acuerdo con L. S. Khuong *et al.*, 2016, el bioetanol tiene las siguientes ventajas que lo hacen factible como uso de combustible renovable:

- El bioetanol tiene un índice de octanaje y un contenido de oxígeno más altos, que son deseables para motores de gasolina y diésel.
- La quema de bioetanol produce menos emisiones de hollín, óxido de carbono e hidrocarburos no quemados en comparación con los combustibles fósiles.
- Se quema limpiamente debido al mayor contenido de octanaje, produciendo emisiones más limpias. Esto reduce la cantidad de aditivos de octano.
- El uso de mezclas de bioetanol y gasolina como el E85 puede ayudar a reducir las emisiones de gases de efecto invernadero.
- Tiene límites de inflamabilidad más amplios, mayor velocidad de llama, mayor calor de vaporización, mayor relación de compresión y menor tiempo de encendido, lo que mejora la combustión de combustible en comparación con los combustibles fósiles.

- La combustión de bioetanol produce emisiones que son menos reactivas a la luz solar en comparación con la gasolina. Por lo tanto, el uso de bioetanol es menos perjudicial para el medio ambiente y la capa de ozono en comparación con los combustibles fósiles.
- El bioetanol es biodegradable y no contiene compuestos aromáticos como olefinas y diolefinas.
- Es menos tóxico en comparación con los combustibles fósiles.
- El uso de bioetanol ayuda a brindar seguridad energética ya que reduce las importaciones de petróleo de países extranjeros debido a que el bioetanol se puede producir en el país.

Sin embargo, menciona algunas de las desventajas que el bioetanol presenta:

- Es miscible con agua y, por tanto, tiene un efecto corrosivo sobre los componentes del motor.
- Tiene un efecto indeseable en las bombas de combustible eléctricas, ya que aumenta el desgaste interno y genera chispas.
- Tiene menor poder calorífico y menor densidad energética, lo que conduce a un mayor consumo de combustible para generar la misma potencia del motor que los combustibles fósiles convencionales.
- El etanol puro es difícil de vaporizar, lo que dificulta el arranque del vehículo en climas fríos.
- Tiene una mayor tendencia a llegar al cárter, ya que tiene un calor de vaporización más alto en comparación con los combustibles fósiles y, por lo tanto, contamina el aceite del motor [42].

El etanol y bioetanol tienen la misma composición química, sin embargo, la diferencia entre estos es la materia prima de la que se obtiene ya que el bioetanol

proviene de fuentes renovables. No obstante, la producción el método de producción dependerá de que generación de bicomcombustible se trate como se mencionó anteriormente. En general, los materiales básicos para producir biocombustibles deben tener ciertas características, incluidas altas concentraciones de carbono e hidrógeno y bajas concentraciones de oxígeno, nitrógeno y otros componentes orgánicos [15].

El bioetanol de tercera generación se obtiene a partir de algas las cuales son muy eficientes para convertir la luz, el agua y el CO₂ en biomasa en un sistema que no necesariamente requiere tierras agrícolas [38].

Además, las algas pueden crecer tanto en aguas dulces como en saladas, incluso en aguas residuales. debido a su contenido de carbohidratos se puede generar bioetanol, no obstante, la composición de la biomasa se ve afectada por las condiciones de cultivos.

Las microalgas son la materia prima que más se ha investigado para la producción de bioetanol, sin embargo, existen las macroalgas de las cuales tienen un 50 % de carbohidratos en su composición total de biomas, por lo que han sido estudiadas en este trabajo, además de que se busca una solución a la problemática de la abundancia masiva las macroalgas *Sargassum spp.* que se ha presentado en 2011.

2.4 *Sargassum spp.*

Hay muchas especies del género *Sargassum* distribuidas en aguas tropicales y subtropicales, pero solo dos, *S. natans* y *S. fluitans* (Figura 2.6), tienen un ciclo de vida completamente pelágico y ofrecen estructuras de apoyo ecológico de diferentes formas en ambientes que de otro modo serían pobres en nutrientes [43]

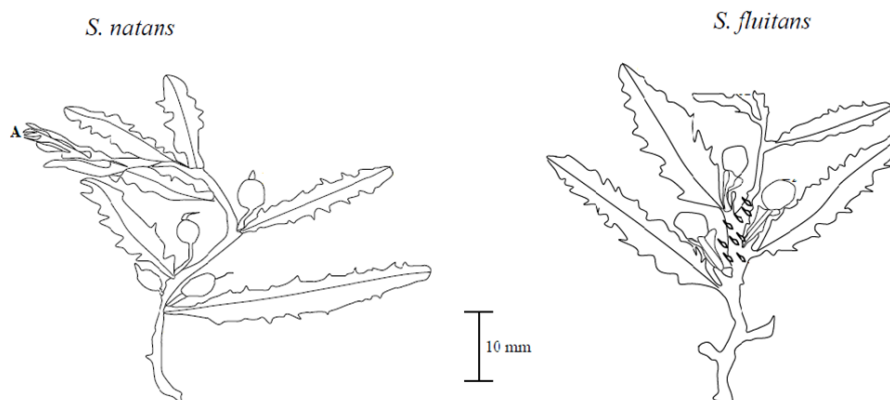


Figura 2.6: *Sargassum natans* y *fluitans*. De Identification and chemical studies of pelagic masses of *Sargassum natans* (Linnaeus) Gaillon and *S. fluitans* (Borgesen) Borgesen (brown algae), found offshore in Ondo State, Nigeria, por O. O. Oyesiku et al., 2014, African Journal of Biotechnology, Vol. 13(10), pp. 1188-1193.

Estas dos especies de *Sargassum* spp. físicamente son muy similares, sin embargo, morfológicamente tienen diferencias [44], por lo tanto en la Tabla 2.2 se presenta la morfología de *S. natans* y *S. fluitans*.

Tabla 2.2: Morfología de las especies de *Sargassum*: *S. natans* y *S. Fluitans*

Especies	<i>S. natans</i>	<i>S. fluitans</i>
Tallo	Plano en un lado y delgado ahusado	Plano en un lado con ramitas
Forma de hoja	Estrecho, lineal-oblongo	lanceolado-elíptico
Tamaño de hoja	1-3 ^a x 15-20 ^b	3-5 ^a x 15-21 ^b
Ápice de la hoja	Obtuso	Agudo
Margen de la hoja	Poco dentado	Profundamente dentado
Vesícula	Con punta de espina (aprox. 1-2 ^a x 0.5-3 ^b mm)	Sin punta de espina (aprox. 1-3 ^a x 1-3 ^b mm)
Tallo de vesícula	Largo y delgado (aprox. 1-3 mm)	Largo y alado (aprox. 1-3 mm)

^arango de ancho ^brango de longitud

Estas diferencias morfológicas pueden dictar el valor del hábitat para la comunidad de fauna asociada [43]. De igual forma, O. Oyesiku, *et al.*, 2014, analizó los minerales contenidos en la mezcla de las especies de *Sargassum* antes mencionadas Tabla (2.3).

Tabla 2.3: Contenido de minerales de la mezcla de *S. natans* y *S. Fluitans*

Mineral	mg/100 g
Fósforo	96.5 ± 2.12
Magnesio	42.75 ± 0.35
Potasio	28.0 ± 0.74
Planchar	8.7 ± 0.28
Nitrógeno (Kjeldahl)	6.360. ± 0.2
Zinc	0.05 ± 0.0
Yodo	0.04 ± 0.0

En cuanto al análisis de humedad de las dos especies de algas se encontró que cada una tiene una capacidad de absorción diferente como se puede observa en la Tabla 2.4. Respecto a las propiedades proximales de las dos especies en base seca se tiene lo siguiente presentado en la Tabla 2.5. Como se puede observar ambas especies cuentan con casi el 50 % de celulosa, la cual podría ser transformada en energía mediante diferentes procesos de conversión como la hidrólisis y fermentación, con el fin de obtener biocombustibles [45].

Tabla 2.4: Análisis de humedad total (%) de las dos especies de *Sargassum*

Humedad			
		<i>S. natans</i>	<i>S. fluitans</i>
	n	9	9
Aire	x	79.36	81.33
	σ	0.45	1.13
Estufa 70 °C	x	82.65	85.05
	σ	0.12	1.03

Panel en línea: Arribazón de sargazo en el Caribe Mexicano
 Panelista: Pereira-Corona, Alberto.

Tabla 2.5: Resumen de las propiedades proximales (%) de las dos especies de *Sargassum*

Base seca			
		<i>S. natans</i>	<i>S. fluitans</i>
Cenizas totales	x	29.12	27.35
	σ	0.65	1.32
Extracto etéreo	x	3.81	2.87
	σ	0.68	0.51
Lignina	x	0.51	0.52
	σ	0.02	0.03
Celulosa	x	38.35	41.70
	σ	0.36	1.25
Hemicelulosa	x	17.28	12.79
	σ	2.74	1.60
Proteína cruda	x	11.15	12.00
	σ	3.89	9.31

Panel en línea: Arribazón de sargazo en el Caribe Mexicano
Panelista: Pereira-Corona, Alberto.

Como se ha mencionado anteriormente estas dos especies de *Sargassum* han tenido un florecimiento abundante y arribo masivo en las costas de Caribe, lo cual tiene un efecto negativo, por tal motivo se han investigado diferentes usos que se les puede dar y que ayuden a mitigar el problema. Entre las soluciones está el uso de estas algas como fuente de biocombustibles ya que como menciona L. O. Kyung & E. Y. Lee, 2016, las algas pardas tienen varias ventajas como materia prima para la producción de biocombustibles:

- Las algas pardas evitan la competencia con la producción de alimentos.
- No requieren tierras arables y se cultivan en el océano mediante la acuicultura sin necesidad de los costosos nutrientes, fertilizantes o agua dulce que se requieren para la agricultura convencional.

- No existe ningún problema moral asociado con el uso de algas pardas para la producción de biocombustible.
- Una ventaja particularmente importante es que las algas pardas pueden ofrecer altos rendimientos de biomasa por acre.
- Las algas pardas contienen altos niveles de carbohidratos, contribuyendo hasta el 55 % (p / p) de la biomasa seca [17].

Por lo tanto, las algas pardas son una biomasa renovable y sostenible ideal debido a su abundancia y altos niveles de azúcar que se pueden utilizar para la producción de bioetanol y productos químicos [46]. Aproximadamente 70 millones de toneladas secas de macroalgas se cultivan y recolectan en todo el mundo en granjas costeras en alta mar y cerca de la costa (citado de [46]). Sin embargo, la desventaja que presentan es el complejo método que se usa y los altos costos de producción que requieren.

2.5 DESARROLLO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL.

La conversión de biomasa vegetal a bioetanol puede ser mediante diferentes procesos químicos, térmicos y biológicos.

Como se ha mencionado anteriormente existen diversos procesos de tratamiento para la producción de biocombustibles, estos se determinan de acuerdo con la materia prima que está siendo utilizada, a los costos de producción y al tipo de combustible que se pretende obtener, como se puede observar en la Figura 2.7, se muestra una descripción general de los procesos de conversión de materias primas de biomasa vegetal en biocombustibles.

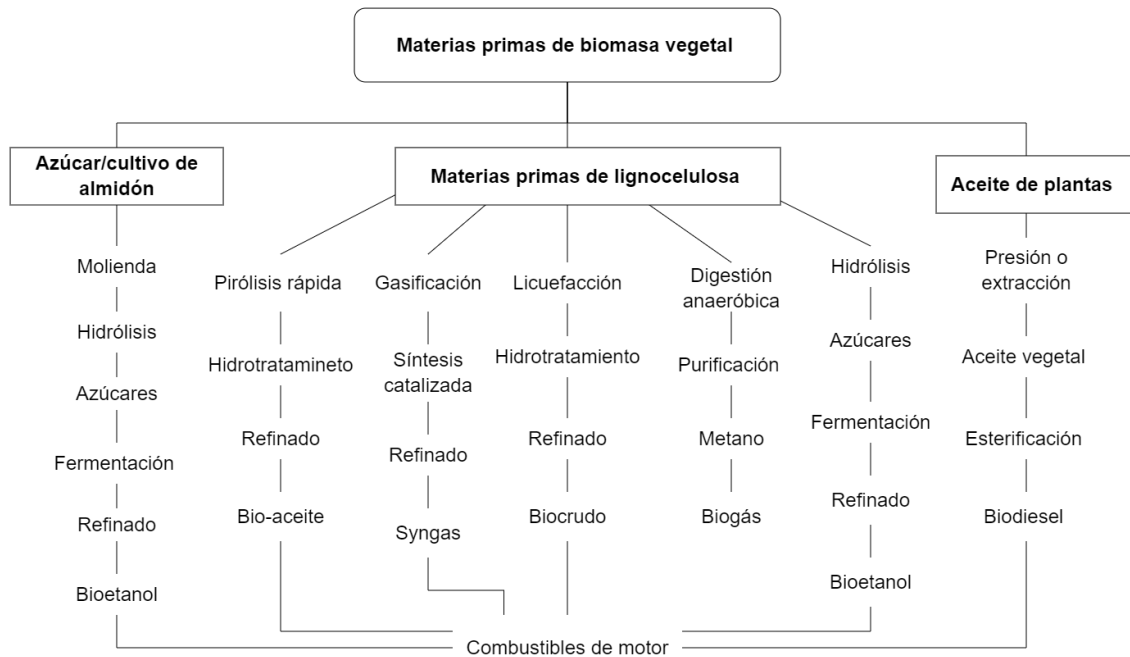


Figura 2.7: Procesos generales de la producción de biocombustibles a partir de material lignoceluloso. Algae Energy. *Algae as a New Source of Biodiesel*, por M. F. Demirbas, Ayhan, Demirbas, 2010, 1st ed. Springer-Verlag London.

En cuanto al proceso de producción de bioetanol a partir de algas se debe tomar en cuenta que las algas son de material lignocelulósico, por lo que se requiere de una conversión de celulosa a azúcares fermentables. Algunos métodos para realizar dicha conversión pueden ser:

- Hidrólisis química: hidrólisis ácida.
- Biológico: Hidrólisis enzimática.

Después de obtener los azúcares fermentables se realiza el proceso de fermentación mediante levaduras capaces de producir bioetanol. En la Figura 2.8 se puede observar el proceso de producción de biocombustibles de tercera generación a partir de algas pardas.

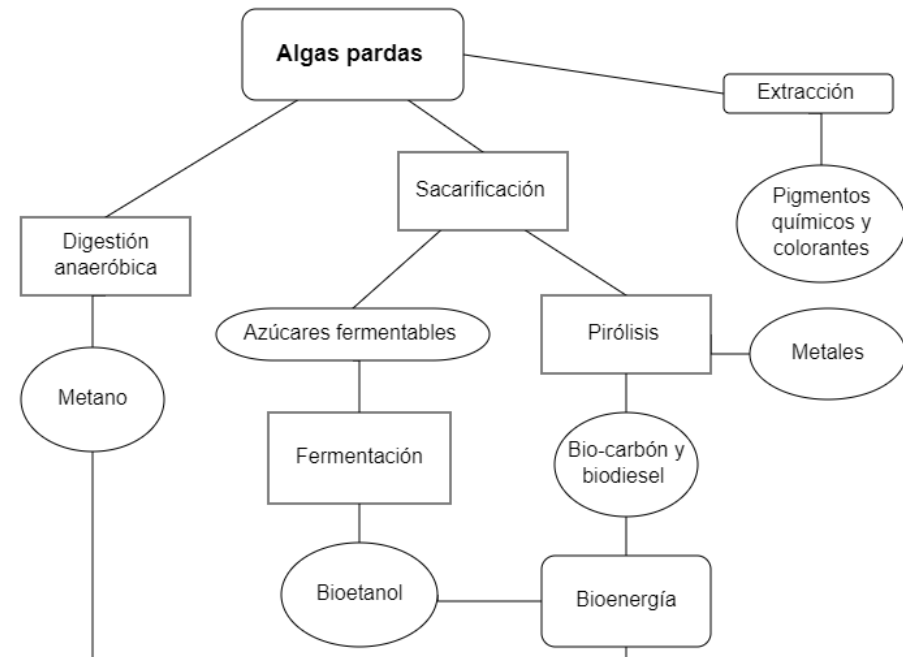
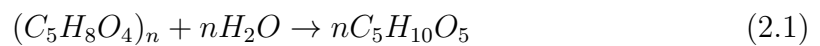


Figura 2.8: Proceso de producción de biocombustibles a partir de algas pardas.

La hidrólisis (sacarificación) descompone los enlaces de hidrógeno en las fracciones de hemicelulosa y celulosa en sus componentes de azúcar: pentosas y hexosas. Estos azúcares pueden fermentarse en bioetanol. La hidrólisis de celulosa [hexosan, $(C_6H_{10}O_5)_n$] produce glucosa (una hexosa, $C_6H_{12}O_6$) [36].

La hidrólisis de celulosa es catalizada por ácidos minerales y enzimas. Hexosan a hexosa, reaccionando de la forma que se observa en la ecuación 2.1:



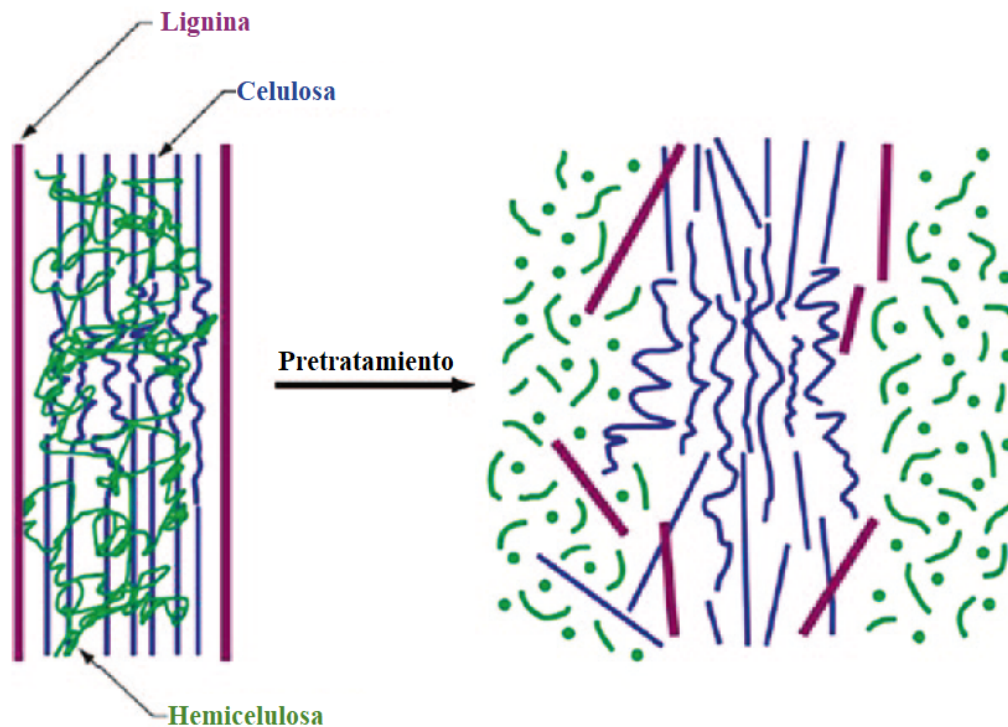


Figura 2.9: Representación esquemática de la hidrólisis de material lignocelulósico. De *Advances in bioethanol*, por P. Bajpai, 2013, 1st ed., Springer.

Los métodos de hidrólisis más utilizados son el ácido y el enzimático. Se utiliza tanto ácido diluido como concentrado. El tratamiento con ácido diluido se emplea para la degradación de la hemicelulosa dejando la red de lignina y celulosa en el sustrato (Figura 2.9). Tanto la hidrólisis enzimática como la química requieren un pretratamiento para aumentar la susceptibilidad de los materiales celulósicos [36].

2.5.1 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Los polisacáridos (almidón) constan de unidades de glucosa unidas por enlaces glicosídicos. El almidón está compuesto por dos moléculas diferentes. Estos son amilosa y amilopectina. En la amilosa, las moléculas de glucosa están unidas de forma lineal. Además, las moléculas de glucosa están dispuestas de forma lineal y con

un tipo diferente de enlace entre dos glucosas adyacentes. Este enlace conduce a la formación de una estructura ramificada. El almidón de plantas y microalgas incluye generalmente 20-30 por ciento de amilosa y 70-80 por ciento de amilopectina. Las moléculas de almidón se descomponen mediante amilasas, enzimas y se convierten en unidades de glucosa. Por otro lado, la celulosa se presenta en las paredes celulares de las microalgas. Este polisacárido se compone de varios cientos a miles de unidades de glucosa enlazada ($1 \rightarrow 4$). Las celulosas son hidrolizadas por celulasas. Estas enzimas hidrolizan unidades de glucosa unidas ($1 \rightarrow 4$) y convierten los polisacáridos en unidades de glucosa [47].

El tratamiento enzimático involucra enzimas comerciales como celulasas (endoglucanasa, celobiohidrolasa y celobiasa), amilasa y agarasa para hidrolizar los polisacáridos complejos de macroalgas (por ejemplo, celulosa, almidón y agar) en azúcar reductor monomérico, por ejemplo, glucosa y galactosa [48].

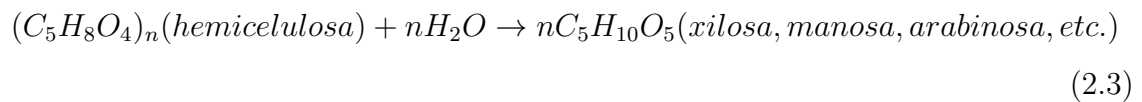
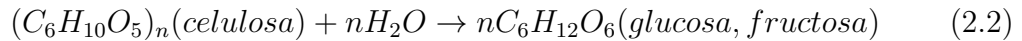
De acuerdo con K. Li, *et al.*, 2014 [49], la hidrólisis enzimática presenta la siguientes ventajas:

- En comparación con la hidrólisis ácida, la hidrólisis enzimática requiere menos energía y condiciones ambientales suaves (pH 4.5 - 5.0 y temperatura 40 - 50 ° C).
- No tiene problemas de corrosión.
- Tiene un bajo consumo de utilidad y una baja toxicidad de los hidrolizados como las principales ventajas de este proceso.

2.5.2 HIDRÓLISIS ÁCIDA

El proceso de ácido diluido se realiza a temperaturas de 120 °C a 220 °C y presiones de 34,473.8 [50] a 120,000 Pa [51] (pascales) y tiene un tiempo de reacción

en el rango de segundos o minutos. El proceso de ácido concentrado utiliza temperaturas relativamente suaves, pero a una alta concentración de ácido sulfúrico y una presión mínima involucrada [15]. A continuación se presentan algunas reacciones bioquímicas [14].



2.5.3 HIDRÓLISIS ÁCIDA DILUIDA

El pretratamiento con ácido diluido (0,5-1,0 % de ácido sulfúrico) a temperaturas moderadas (140-190 °C) puede eliminar y recuperar eficazmente la mayor parte de la hemicelulosa como azúcares disueltos. Con este método, los rendimientos de glucosa de la celulosa aumentan con la eliminación de la hemicelulosa hasta casi el 100 % [52].

La hidrólisis ácida diluida consta de dos tipos de reacciones químicas. Una reacción convierte los materiales celulósicos en azúcar y la otra convierte los azúcares en otras sustancias químicas, muchas de las cuales inhiben el crecimiento de microbios de fermentación posteriores. Las mismas condiciones que causan que ocurra la primera reacción, simultáneamente causan la sobredegradación de azúcares y lignina, creando compuestos inhibidores como ácidos orgánicos, furanos y fenoles [52].

El furfural es un derivado del azúcar pentosa, está presente en el hidrolizado de hemicelulosa en una concentración de 1-4 gL⁻¹, pero puede inhibir el crecimiento de *E. coli* y otros organismos en concentraciones tan bajas como 2.4 g L⁻¹. Mientras que

otros aldehídos, como el 4-hidroxibenzaldehído y el siringaldehído, son más tóxicos que el furfural en función del peso, la presencia de furfural mejora el efecto de otras toxinas [25].

2.5.4 HIDRÓLISIS ÁCIDA CONCENTRADA

La hidrólisis ácida concentrada (aproximadamente un 70% de contenido de ácido) utiliza una temperatura baja (38 ° C / 100 ° F) y una presión baja. La tasa de recuperación de celulosa del proceso de pretratamiento inicial y la tasa de conversión de celulosa a glucosa bajo este proceso son mucho más altas (90%) que con la hidrólisis ácida diluida. De igual manera, B. Zhang & A. Shabazi, 2011, mencionan que la hidrólisis ácida concentrada tiene la ventaja que a bajas temperaturas y presiones empleadas permiten el uso de materiales de costo relativamente bajo, como tanques y tuberías de fibra de vidrio.

A pesar de ello, las debilidades que presenta, en comparación con otros procesos, son su tasa de conversión relativamente lenta y el hecho de que es necesario desarrollar sistemas de recuperación de ácido más económicos y eficientes. A menos que se elimine el ácido, se deben usar grandes cantidades de cal para neutralizar la solución de azúcar, que requiere la eliminación de sales. Esto aumenta el costo y encarece el producto final [52].

En este proceso de hidrólisis ácida se forman varios compuestos capaces de inhibir la fermentación. Por lo tanto, se recomienda realizar una detoxificación para eliminar estos compuestos.

2.6 DETOXIFICACIÓN

Es el proceso que consiste en eliminar compuestos formados en la hidrólisis, los cuales pueden inhibir la fermentación. Debido a la reacción de la hidrólisis se pueden formar compuestos como furfurales, hidromexilfurfurales, ácido acético y levulínico [53], entre otros Figura 29, los cuales pueden resultar perjudiciales para las levaduras o bacterias que realizaran la fermentación, lo que ocasionaría una menor producción de bioetanol.

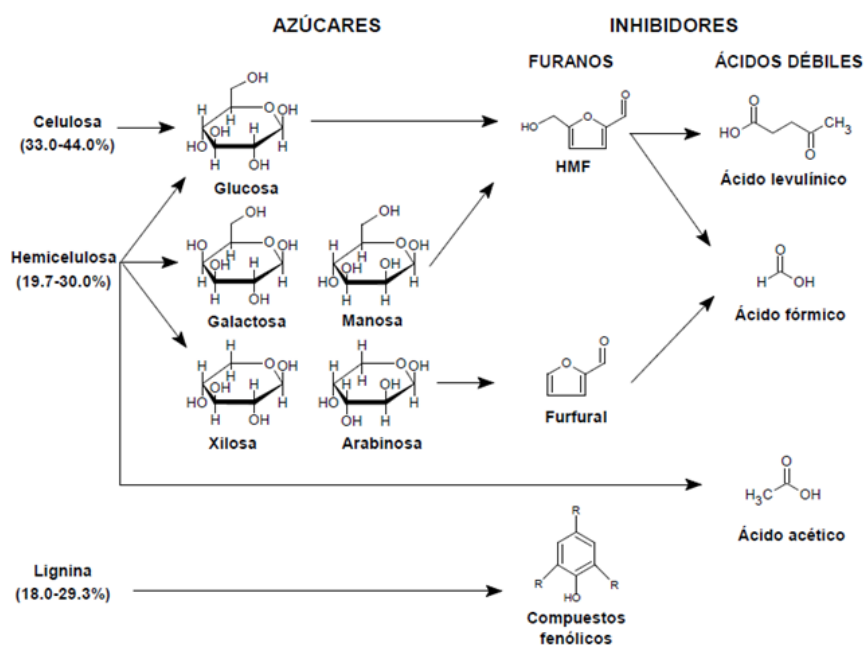


Figura 2.10: Composición del bagazo de la caña y principales inhibidores. De “Hidrólisis ácida de materiales lignocelulosicos y detoxificación por pervaporación,”, por O. J. Jaramillo-Pineda, 2013, Universidad Nacional de Colombia, 2013.

La detoxificación se puede realizar mediante diferentes métodos, la diferencia entre cada método es el compuesto químico y las condiciones de temperatura, pH y agitación que cada uno determina. Algunos de los compuestos químicos que se usan en la detoxificación son carbón activado e hidróxidos como calcio y sodio.

A continuación, se presentan algunos métodos de detoxificación:

Detoxificación con Hidróxido de calcio: La detoxificación consiste en añadir hidróxido de calcio (CaOH) a la muestra hidrolizada hasta alcanzar un pH 11, con agitación, y mantener por 30 minutos a 30 °C. Filtrar nuevamente después de los 30 minutos. Después ajustar a pH 6 usando H₂SO₄ concentrado [22].

Detoxificación con Hidróxido de Sodio. Para este proceso se utilizan perlas de hidróxido de sodio hasta alcanzar un pH de 12 unidades. Las condiciones de operación requeridas son 60 °C a 150 rpm durante 1 hora (citado de [54])

Detoxificación con Carbón Activado. Para este proceso se utiliza carbón activado para reducir el pH del hidrolizado con condiciones de operación de 60 °C a 150 rpm durante 1 hora. (citado de [54])

Para una mejor eficacia se pueden combinar y aplicar varios métodos de detoxificación a una misma muestra hidrolizada.

2.7 FERMENTACIÓN

La fermentación se define como un cambio químico provocado por el uso de microorganismos. La respiración es el proceso por el cual un organismo oxida los alimentos para producir energía [55].

La producción de alcohol por la acción de la levadura sobre malta o extractos de frutas se ha llevado a cabo a gran escala durante muchos años y fue el primer proceso industrial para la producción de un metabolito microbiano [56].

Existen varios tipos de fermentación en los que destacan la fermentación alcohólica, láctica y acética, la diferencia entre estas es que los organismos que se encarga de realizar el proceso de convertir en glúcidos son diferentes los cuales pueden ser, levaduras y bacterias, por lo que a partir de ello se obtendrá el producto resultante.

Existen dos tipos de fermentación:

La fermentación aeróbica: consiste en llevar el proceso en presencia de oxígeno y, la anaeróbica, cuyo proceso consiste en realizarlo en ausencia de oxígeno. Se ha reportado que las levaduras tienen un mayor crecimiento en presencia de oxígeno y estas pueden convertir azúcares en agua y dióxido de carbono que les sirve de energía que usan para reproducirse [57].

Fermentación anaeróbica: En estas condiciones las levaduras pierden más energía debido a que usan más azúcares [57].

En cuanto a la producción de bioetanol/etanol los organismos más usados son las levaduras. Las levaduras están conformadas de una sola célula madre que pueden formar nuevas células [57].

2.8 *Saccharomyces cerevisiae*.

Es también conocida como la levadura de cerveza, ya que se usa para la fermentación de bebidas alcohólicas. Es una levadura heterótrofa, que obtiene la energía a partir de la glucosa y tiene una elevada capacidad fermentativa.

Es importante mencionar que se ha demostrado que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es muy vigorosa y está bien adaptada para la conversión de azúcares reductores en hidrolizados celulósicos en bioetanol [22].

CAPÍTULO 3

HERRAMIENTAS Y MÉTODOS

En esta sección se presentan las diferentes herramientas y métodos que se utilizaron en el desarrollo de la metodología de este trabajo. Primeramente, se describe el método de optimización que se aplicó a la hidrólisis ácida. Seguidamente, se mencionan los métodos cualitativos y cuantitativos para el análisis de azúcares, así como las herramientas que se usaron para su realización. Por último, se describe el método y técnica para análisis de bioetanol.

3.1 MÉTODO DE OPTIMIZACIÓN

3.1.1 METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA (RSM)

Como describen D. Montgomery, 2012 y C. Gil-Martínez, 2019, la RSM son técnicas matemáticas y estadísticas que se usan para el modelado y análisis de ejercicios en los que diferentes variables $(\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_k)$ influyen la respuesta de interés que se busca optimizar. [58][59].

La relación estará dado por la función 3.1:

$$y = f(\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_k) + \epsilon \quad (3.1)$$

Donde ϵ representa el ruido o error observado en la respuesta. Si denotamos la respuesta esperada por $E(y) = f(x_1, X_2) = \eta$, entonces la superficie de respuesta estará representada por la función 3.2:

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_k) \quad (3.2)$$

la cual es llamada superficie de respuesta.

La relación de la respuesta y y variables independientes no se conocen, por lo que el objetivo de la RSM es definir una aproximación que nos determine la relación con la que estas cuenta 3.3). Usualmente, se emplea un polinomio de bajo orden en alguna región de las variables independientes. Si la respuesta esta bien modelada por una función lineal de las variables independientes, entonces la aproximación de la función será un modelo de primer orden:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \epsilon \quad (3.3)$$

También se usan modelos de segundo orden (Función 3.4 al existir una curvatura en el sistema:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon \quad (3.4)$$

Como realizar una RSM:

- **Definir los objetivos de la optimización:** plantear el problema a resolver y seleccionar la variable respuesta a evaluar.
- **Escoger factores de interés** y la región de operabilidad en función de la información o conocimiento sobre el proceso a estudiar y las posibilidades instrumentales.
- **Elaborar un diseño experimental** de superficie de respuesta.
- **Ajustar a un modelo matemático** de primer/segundo orden y evaluar si son adecuados.
- **Localizar el óptimo buscado para la respuesta**, utilizando herramientas gráficas y matemáticas.
- **Validar experimentalmente** midiendo la respuesta utilizando los niveles óptimos de los factores obtenidos, y comprobar si se encuentra en consonancia con lo predicho por el modelo.

3.1.2 MÉTODO DE MÁXIMA PENDIENTE EN ASCENSO/DESCENSO

La RSM es un procedimiento secuencial. Si maximizar la respuesta es el objetivo se puede usar el método de máxima pendiente para determinar la dirección. De la misma manera, se puede seguir el método de máxima pendiente en descenso si el objetivo es minimizar la respuesta. Este procedimiento secuencial seguirá hasta

que el aumento o disminución de la respuesta dejen de darse o sean muy pequeños. Cuando se llega a la cercanía del óptimo y existe falta de ajuste del modelo de primer orden, pasamos a ajustar un modelo polinómico de segundo orden.

3.1.2.1 ALGORITMO

Un algoritmo utilizado para determinar las coordenadas de la trayectoria de máxima pendiente en ascenso es el siguiente:

1. Se escoge un tamaño de incremento para una de las variables independientes Δx_j . Normalmente, se elige la variable con mayor coeficiente de regresión absoluto $|\beta_j|$ ó el más conocido.
2. Se aplica el incremento en el resto de variables:

$$\Delta x_i = \frac{\beta_i}{\beta_j / \Delta x_j} \quad (3.5)$$

donde $i = 1, 2, \dots, k_i \neq j$.

3. Se convierte Δx_i a unidades naturales.

3.1.3 LOCALIZACIÓN DEL PUNTO ESTACIONARIO

Los niveles o valores de los factores x_1, x_2, \dots, x_k será igual a 0 en las derivadas parciales 0 que optimizarán la respuesta (función 3.6):

$$\frac{\partial y}{\partial x_1} = \frac{\partial y}{\partial x_2} = \dots = \frac{\partial y}{\partial x_k} = 0 \quad (3.6)$$

Si la respuesta incrementa o se reduce se presenta con el punto estacionario ya que representa lo puntos mínimos, máximos (Figura 3.1).

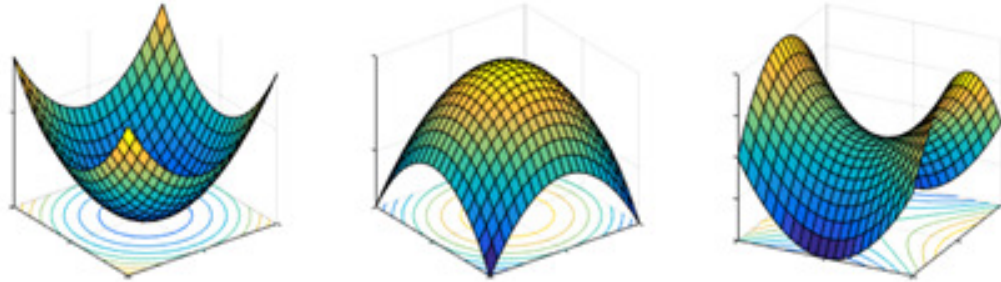


Figura 3.1: De izquierda a derecha se pueden apreciar los puntos estacionarios: mínimo, máximo centro.

3.1.4 DISEÑOS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

Determinar los parámetros del modelo de manera efectiva se debe realizar diseño experimental para la recolección de los datos necesarios. Para lograr un diseño correcto se deben considerar las siguientes características:

- Permite estudiar la adecuación del modelo (falta de ajuste).
- Proporciona estimadores precisos de los coeficientes del modelo.
- Proporciona una estimación interna del error.
- Permite realizar experimentos en bloques.
- No requiere de un gran número de experimentos.
- No requiere de demasiados niveles de las variables independientes.

3.1.5 DISEÑOS PARA MODELOS DE SEGUNDO ORDEN

Existen diseños factoriales de 3 que se usan para considerar algunos parámetros de modelos polinómicos de segundo grado podrían utilizarse diseños factoriales de

3^k , pero para ello requeriría de un número de combinaciones muy alto. Existen otra clase de diseños que permiten ajustar este tipo de modelo con un menor número de combinaciones. Entre ellos están:

- Diseños Centrales Compuestos.
- Diseños Box-Behnken.

3.1.5 DISEÑOS CENTRALES COMPUESTOS

Se trata de la clase más popular para ajustar modelos de regresión cuadrática.

3.1.5.0 CIRCUNSCRITO (CCC)

Los puntos experimentales a obtener con este diseño son representados con la función 3.7:

$$N = n_f + 2k + n_c \quad (3.7)$$

donde:

- n_f : 2^k puntos factoriales: determinan los máximos y mínimos de cada variable..
- $2k$ puntos axiales: nuevos extremos máximo y mínimo de cada factor.
- n_c puntos centrales replicados.

El diseño central compuesto requiere especificar, además, un parámetro adicional determinante para ubicar los puntos axiales:

- Distancia (α) los puntos axiales al centro del diseño (3.8):

$$\alpha = (2^k)^{1/4} \quad (3.8)$$

Por lo tanto el diseño tendrá 5 niveles correspondientes a los puntos axiales mínimos y máximos $(-\alpha, \alpha)$ y a los puntos factoriales; mínimo, central y máximo $(-1, 0, +1)$. En la Fig.

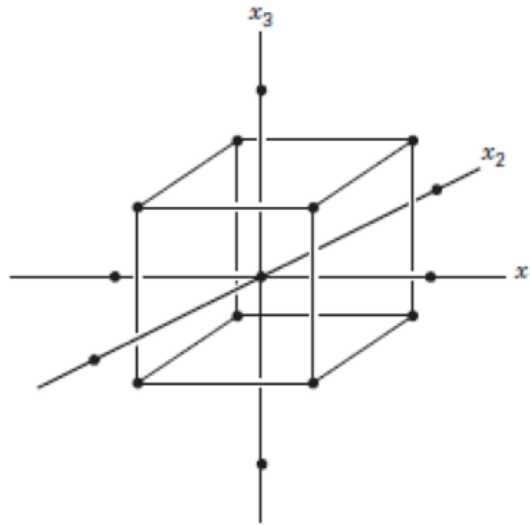


Figura 3.2: DCC inscrito correspondiente a k igual a tres factores

3.2 ANÁLISIS DE AZÚCARES

3.2.1 PRUEBA DE FEHLING

Es una reacción de los reactivos de Fehling los cuales al estar en contacto con glúcidos reductores forman un precipitado color rojo (Figura 3.3), que indica si es glúcido reductor.

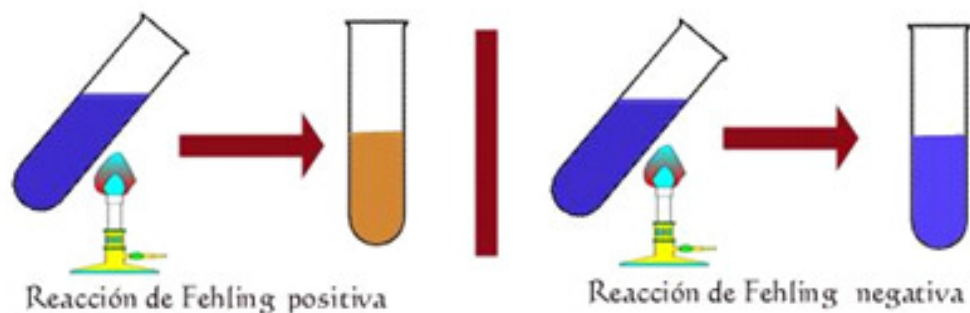


Figura 3.3: Representación de la reacción positiva y negativa de la prueba de Fehling.

3.2.2 ESPECTROFOTOMETRÍA

Es una técnica que analiza la radiación electromagnética con la interacción de moléculas. En esta técnica se usa luz para suscitar electrones y cuando un espectro se obtiene la absorción de luz es determinada por una longitud o frecuencia (Figura 3.4).[60]

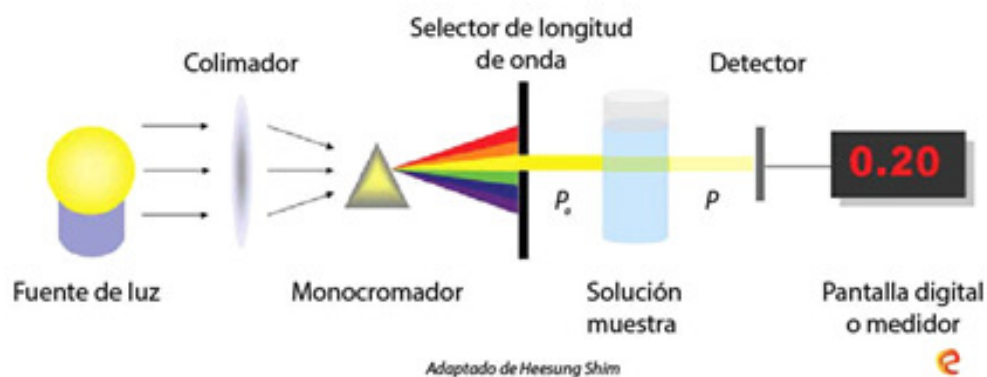


Figura 3.4: Representación esquemática de la espectrofotometría.

3.2.3 MÉTODO FENOL-SULFÚRICO

Es un método físico en el cual se dividen los elementos en dos fases debido a sus diferentes tasas de llegada. [61].

Coefficiente de correlación múltiple

El coeficiente de correlación múltiple es la correlación entre los valores de la variable y las mejores predicciones que se pueden calcular linealmente a partir de las variables predictivas, en este caso se tienen como variables la absorbancia y concentración de las cuales se realizó la curva de calibración obteniendo un coeficiente de correlación de la glucosa.

El coeficiente de correlación múltiple toma valores entre .00 y 1.00; un valor más alto indica una alta predictibilidad de la variable dependiente a partir de las variables independientes, con un valor de 1 que indica que las predicciones son exactamente correctas y un valor de 0 que indica que ninguna combinación lineal de las variables independientes es un mejor predictor que la fija.

3.3 ANÁLISIS DE ALCOHOLES

3.3.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a ser separados son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria mientras la otra se mueve en una dirección definida. Los componentes son separados por sus diferentes tasas de migración. La cromatografía puede ser clasificada por su utilidad y en base al material que se utilice como eluyente para separar los solutos. De acuerdo con su utilidad la cromatografía se clasifica en: analítica, utilizada para determinar los químicos presentes en una mezcla y en que concentración; y

preparativa, utilizada para purificar grandes cantidades de químicos [62].

El cromatógrafo que se usó para este trabajo ha sido el Bruker 450 GC (Figura 3.5), este cromatógrafo trabaja con un sistema de datos de cromatografía, Galaxie, el cual es una plataforma de software de cromatografía de 32 bits de última generación que ofrece una selección de menús desplegables completos de tareas, iconos fáciles de usar y menús emergentes de fácil acceso dentro de ventanas específicas.



Figura 3.5: Cromatógrafo Bruker 450 GC.

3.3.2 TÉCNICA HEADSPACE

Headspace una muestra líquida o sólida se termostatiza en un recipiente cerrado (un vial) hasta que los componentes volátiles presentes en la muestra alcancen el equilibrio entre la muestra propiamente dicha y el volumen de gas por encima de ella, el llamado «espacio de cabeza». Posteriormente, se introduce una alícuota del espacio de cabeza en la columna de GC para su análisis (Figura 3.6). El coeficiente de partición controla el equilibrio entre la muestra y el espacio.; sin embargo, al igual que en GC en general, su valor generalmente no se conoce, aunque en algunos casos su conocimiento sería importante, por ejemplo, para juzgar la influencia del volumen de muestra en el vial del espacio de cabeza en la sensibilidad del método y

en la precisión de mediciones repetida.

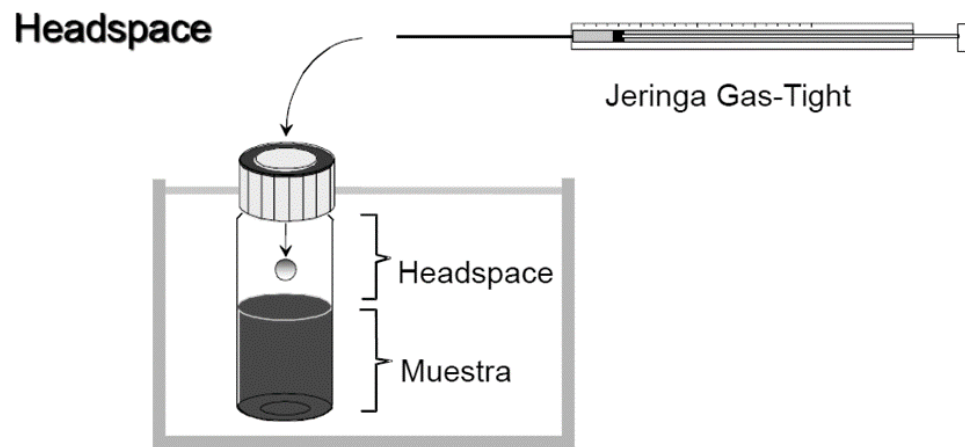


Figura 3.6: Representación de la técnica de Headspace.

CAPÍTULO 4

METODOLOGÍA

En este capítulo se presenta la metodología empleada para la realización de este trabajo. En primer lugar, se presenta el método de optimización aplicado a la hidrólisis ácida. Seguidamente, se detalla cada una de las etapas del proceso de producción de bioetanol. Finalmente, se describen detalladamente la aplicación de las herramientas y métodos para el análisis de azúcares y alcoholes.

La biomasa de algas tiene capacidad para producir bioetanol, debido a su alta concentración de carbohidratos y bajo contenido de lignina. Sin embargo, una desventaja del uso de algas como biomasa para producción de bioetanol es el proceso de producción, ya que requiere de altos costos de producción y tiempo. Por lo tanto, uno de los mayores retos para la obtención de dicho biocombustible es determinar el punto óptimo de la hidrólisis el cual nos determinara las condiciones adecuadas para alcanzar una alta concentración de azúcares fermentables.

Por lo que, en este trabajo se pretende optimizar el proceso de hidrólisis ácida mediante la RSM a partir de 3 variables (tiempo, concentración de reactivo (H_2SO_4) y velocidad de reacción) a nivel laboratorio. Se espera encontrar el punto óptimo de cada variable, el cual se tomará como referencia para la producción de bioetanol.

A continuación, se presenta las herramientas y métodos que se utilizaron para la realización de este trabajo.

4.1 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE BIOETANOL DE LA ETAPA DE HIDRÓLISIS ÁCIDA MEDIANTE EL MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

En este estudio se tiene como objetivo optimizar la etapa de la hidrólisis ácida, con el fin de encontrar el punto el punto óptimo de cada variable estudiada y obtener una alta concentración de azúcares reductores totales. Debido a que la biomasa de algas es una fuente con potencial para la producción de bioetanol ya que por su estructura molecular contiene carbohidratos que pueden ser fermentados y un bajo contenido de lignina que puede ser degradado mediante hidrólisis ácida.

Por lo tanto, se determinaron 3 variables a estudiar para la optimización con el RSM y el software Minitab, la cuales son concentración de reactivo (H_2SO_4), el tiempo y la agitación. Las condiciones del punto óptimo que se determine será a

escala laboratorio.

Por consiguiente, teniendo 3 variables como objeto de estudio se obtiene un diseño central compuesto circunscrito. Para poder estimar con exactitud la significancia de las variables en la ecuación de la superficie de respuesta en un sistema donde se involucran 3 factores, deben realizarse al menos 17 experimentos.

- 8 experimentos para los puntos del cubo (uno por cada punto)
- 6 experimentos para los puntos axiales (uno por cada punto)
- 3 experimentos para el punto central

Ejecutar 3 veces el punto central permitirá estimar el error del proceso que se lleva a cabo durante la experimentación, así como identificar si existe alguna otra variable que afecte al sistema y no esté siendo tomada en cuenta.

Para poder estimar mejor los resultados, las variables involucradas en el experimento deben ser adimensionadas y codificadas (Tabla 4.1), igualando a 1 la distancia entre el punto central y la cara del cubo del DCC, asignando una la distancia de los puntos axiales hasta el centro del sistema dependiendo del tipo de modelo que se requiera, tomando en cuenta que dichos puntos ayudan a recolectar información acerca del comportamiento entre las variables, y no para buscar el punto óptimo del sistema.

Tabla 4.1: Codificación de variables

Corrida	Factor 1	Factor 2	Factor 3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	$-\alpha$	0	0
10	α	0	0
11	0	$-\alpha$	0
12	0	α	0
13	0	0	$-\alpha$
14	0	0	α
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

De las referencias consultadas se puede observar que las variables más estudiadas son:

- Concentración de reactivo.
- Tiempo de reacción
- Temperatura
- Concentración de biomasa

Por lo que en este trabajo se establecieron 3 variables de las cuales se consideran pueden afectar más a la reacción, del mismo modo, de acuerdo con el diseño experimental se establecieron 17 pruebas, de la cual se obtuvo una matriz experimental de las tres variables considerando los valores altos y bajos:

- Concentración de H_2SO_4 (x_1): 0.5 - 2 (M)
- Tiempo (x_2): 30 - 120 min
- velocidad de agitación (x_3): 150 - 300 rpm

Como se puede observar en la Tabla 4.2 las pruebas 1, 10 y 17 son iguales ya que corresponden al punto central del diseño central compuesto (CCD). Las pruebas 11 y 17 son los puntos axiales, los cuales sirven para ajustar mejor el sistema al modelo cuadrático.

Tabla 4.2: Matriz de experimentos

Corrida	x_1 (M)	x_2 (min)	x_3 (rpm)
1	0.5 (-1)	30 (-1)	150 (-1)
2	2 (-1)	30 (-1)	150 (-1)
3	0.5 (-1)	120 (1)	150 (-1)
4	2 (1)	120 (1)	150 (-1)
5	0.5 (-1)	30 (-1)	300 (1)
6	2 (1)	30 (-1)	300 (1)
7	0.5 (-1)	120 (1)	300 (1)
8	2 (1)	120 (1)	300 (1)
9	0.18935 ($-\alpha$)	75 (0)	225 (0)
10	2.31065 (α)	75 (0)	225 (0)
11	1.25 (0)	11.361 ($-\alpha$)	225 (0)
12	1.25 (0)	138.639 (α)	225 (0)
13	1.25 (0)	75 (0)	118.935 ($-\alpha$)
14	1.25 (0)	75 (0)	331.065 (α)
15	1.25 (0)	75 (0)	225 (0)
16	1.25 (0)	75 (0)	225 (0)
17	1.25 (0)	75 (0)	225 (0)

Es importante mencionar que las variables presentadas en la Tabla 4.2 son las independientes, sin embargo, se tomaron en cuenta dos variables dependientes (concentración de azúcares y rendimiento teórico de bioetanol).

4.2 PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL BIOETANOL

Para tener una mejor eficiencia en la producción de bioetanol se determinó un proceso general (Figura 4.1), el cual se presenta a continuación:

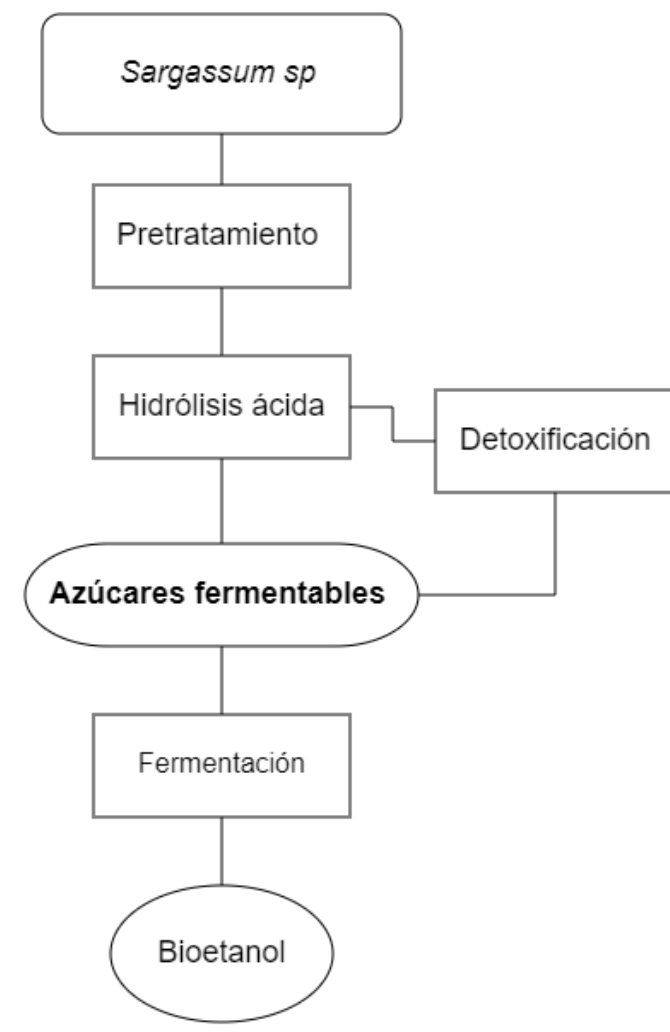


Figura 4.1: Proceso de producción de bioetanol a partir de *Sargassum spp.*

4.2.1 PRETRATAMIENTO

Debido a la afluencia masiva de algas pardas en la Riviera Maya, se terminó su aprovechamiento como materia prima para la obtención de bioetanol. Las algas fueron recolectadas en la Riviera Maya y llevadas en el laboratorio de Ciencias de los combustibles de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Las algas fueron lavadas con agua potable para remover la arena y sales que contenían. Seguidamente se llevaron a secar al sol. Después se trituraron y se recuperaron las partículas menores a 560 μm (Figura 4.2).



Figura 4.2: *Sargassum spp.* triturado y tamizado

4.2.2 HIDRÓLISIS ÁCIDA

El objetivo principal de esta etapa consistió en realizar la conversión de la celulosa del alga en azúcares. Se tomaron 10 g de muestra de algas secas (peso húmedo = 88 g) y trituradas (Figura 4.3), estas fueron colocadas en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de trabajo de 100 ml.



Figura 4.3: *Medición de la masa del Sargassum spp.*

Seguidamente, se usó ácido sulfúrico (H_2SO_4) [16] [18] [20] [21] como catalizador a diferentes concentraciones (0.5 - 2 M), a una temperatura constante de 100 °C (Figura 4.4). La reacción se llevó a cabo de 30 a 120 minutos y una agitación de 150 a 300 rpm, correspondiente a la matriz de experimentos (Tabla 4.2).



Figura 4.4: Representación esquemática del proceso de hidrólisis.

Después del tiempo transcurrido la muestra fue colocadas en hielo para detener la reacción, las fases se separaron mediante filtración y decantación. Del hidrolizado líquido se tomó una muestra de 3 ml para realizar los análisis de azúcares totales. El hidrolizado restante fue llevado a la siguiente etapa del proceso.

4.2.3 DETOXIFICACIÓN

Debido a que puede existir la formación de ácido acético, furfurales y compuestos fenólicos mediante la hidrólisis y los cuales pueden perjudicar la fermentación se recomienda realizar una detoxificación, la cual se utilizó hidróxido de calcio (CaOH) a la muestra hidrolizada hasta alcanzar un pH 11, con agitación, y mantener por 30 minutos a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 4.5)

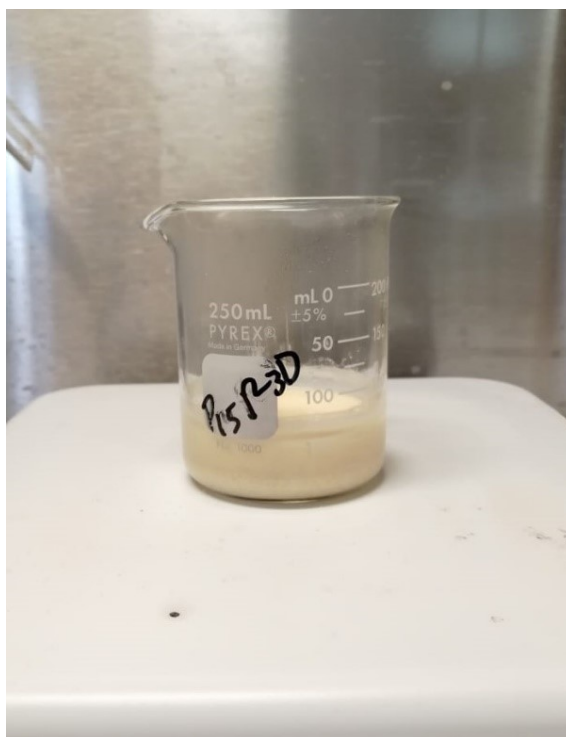


Figura 4.5: Proceso de detoxificación

Después del tiempo de reacción las muestras fueron filtradas con el fin de eliminar los residuos de hidróxido de calcio. Después se ajustó a pH 6 usando H_2SO_4 concentrado [22].

4.2.4 FERMENTACIÓN

Se utilizan levaduras para cambiar los azúcares producidos en etanol y dióxido de carbono.

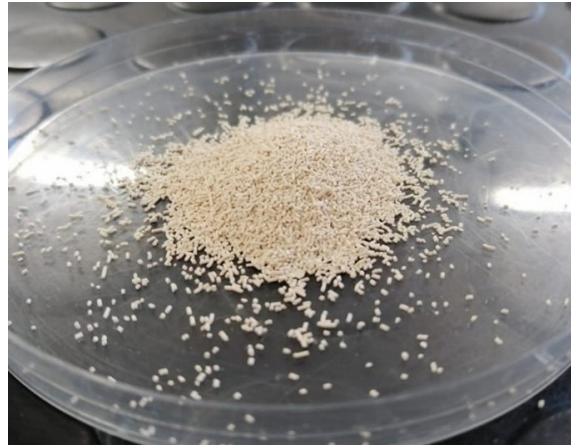


Figura 4.6: Levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae*

Para la fermentación se usó levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* (4.6) a una temperatura constante de 30 °C, a una agitación de 150 rpm [21] durante 24 horas [22] (Figura 4.7).

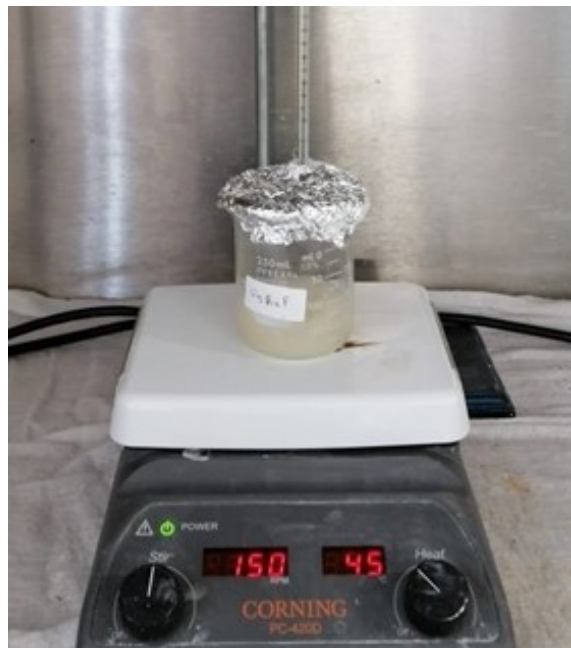


Figura 4.7: Proceso de Fermentación.

4.2.5 DESTILACIÓN

Con el fin de obtener el bioetanol sin residuos de agua, se llevó a cabo una destilación simple, manejando una temperatura de 78 °C (Figura 4.8), dado que es la temperatura de ebullición del etanol.

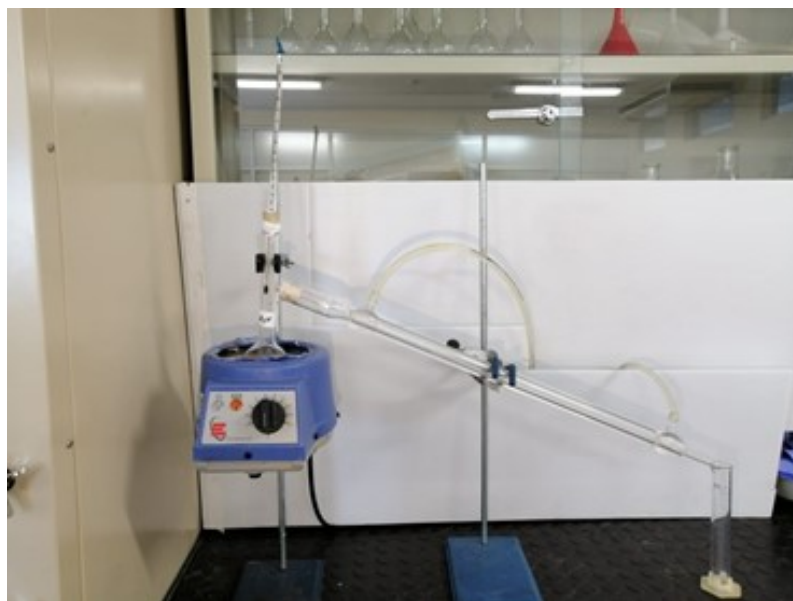


Figura 4.8: Destilación del bioetanol.

4.3 ANÁLISIS DE AZÚCARES

4.3.1 PRUEBA DE FEHLING

Se llevo a cabo la prueba de Fehling para la determinación de manera cualitativa de azúcares, a continuación, se presenta el procedimiento:

1. Verter en tubos de ensayo 2 ml de la solución A de Fehling y 2 ml de la solución B de Fehling (Figura 4.9).

2. Seguidamente, se le agrega 1 ml de la solución muestra.
3. Se calienta en baño María durante 10 min.

Por último, se retiran y se observa el contenido.



Figura 4.9: Reactivo A y B de Fehling (lado izquierdo), reacción de Fehling (lado derecho).

4.3.2 MÉTODO FENOL-SULFÚRICO

4.3.2.1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR

Para el desarrollo de este análisis se procedió a usar el método descrito por J. Yugsi, 2017. El cual consistió en la preparación del patrón mediante glucosa.

Para llevar a cabo el procedimiento se siguieron las instrucciones descritas por J. Yugsi, 2017, quien sugiere preparar los estandarés como se indica en la tabla (4.3)

Tabla 4.3: Realización de los estándares del método fenol-ácido Sulfúrico

No. tubos	Patrón glucosa (mL)	Agua			H ₂ SO ₄	
		destilada (mL)	Fenol 5 %			
Blanco	0	1	0.1		3	
1	0.1	0.9	0.1	1	3	1
2	0.2	0.8	0.1	5	3	5
3	0.3	0.7	0.1		3	
4	0.4	0.6	0.1	m	3	m
5	0.5	0.5	0.1	i	3	i
6	0.6	0.4	0.1	n	3	n
7	0.7	0.3	0.1	u	3	u
8	0.8	0.2	0.1	t	3	t
9	0.9	0.1	0.1	o	3	o
10	1	0	0.1	s	3	s

Las muestras fueron analizadas a una absorbancia de ($\lambda=540$ nm) mediante un espectrofotómetro modelo GENESYS™ 10.

Para el análisis de las muestras hidrolizadas de este estudio (Tabla 4.4) se siguió el procedimiento descrito anteriormente.

Tabla 4.4: Volúmenes de reactivos a utilizar en las muestras con el método Fenol-ácido Sulfúrico.

No. tubos	Patrón glucosa (mL)	Agua destilada (mL)	Fenol 5 %	H ₂ SO ₄		
Blanco	0	1	0.1	3		
			0.1	3		
			0.1	3		
			0.1	1	3	1
Muestras de la 1..n	1 mL de cada muestra		0.1	5	3	5
			0.1		3	
			0.1	m	3	m
			0.1	i	3	i
			0.1	n	3	n
			0.1		3	
			0.1		3	

Seguidamente se miden las absorbancias de cada una mediante un espectrofotómetro y a parti de ellas se obtiene el coeficiente de correlación múltiple.

4.4 ANÁLISIS DE BIOETANOL

4.4.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES – TÉCNICA HEADSPACE

Antes de la cromatografía se aplicó la técnica headspace, la cual consistió en calentar en baño maría cada una de las muestras y extraer lo vapores resultantes con una jeringa para gas (Figur 4.10).

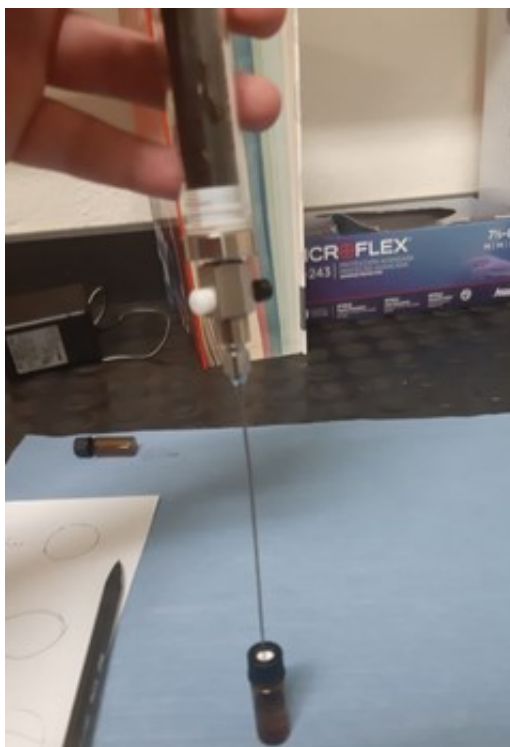


Figura 4.10: Extracción de la muestra de bioetanol.

El cromatógrafo que se utilizo fue un Bruker 450 GC, este cromatógrafo trabaja con un sistema de datos de cromatografía, Galaxie, el cual es una plataforma de software de cromatografía de 32 bits.

Las cromatografías se realizaron en una columna Zebron ZB-Bioetanol con las siguientes dimensiones 30 m L x 1.00 mm df, los límites de temperatura fueron -60 a 360 °C.

Las condiciones de operación fueron las siguientes:

- Temperatura de inyección: 250 °C
- Gas portador: hidrogeno
- Tipo de detector: FID
- Temperatura de detector: 325 °C

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

En esta sección se presentan los resultados obtenidos de la optimización, principalmente, las superficies de respuestas de las variables estudiadas y el punto óptimo. De igual forma, se mencionan los resultados de los análisis de cromatografías realizadas.

5.1 ANÁLISIS DE AZÚCARES

5.1.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES MEDIANTE LA PRUEBA DE FEHLING.

Con este ensayo se determinó la presencia de azúcares reductores, debido a la reacción de los reactivos Fehling con la muestra analizada se presentó la formación de un precipitado rojo ladrillo, lo cual indica la presencia de los azúcares antes mencionados.

Debido a que es un análisis cualitativo de colorimetría se obtuvieron los siguientes datos que se presentan a continuación en la Tabla 5.1:

Tabla 5.1: Resultados obtenidos de la prueba de Fehling (✓) indican un resultado positivo (presencia de azúcares) en cada una de las pruebas

No. de Muestra	Replica 1	Replica 2	Replica 3
1	✓	✓	✓
2	✓	✓	✓
3	✓	✓	✓
4	✓	✓	✓
5	✓	✓	✓
6	✓	✓	✓
7	✓	✓	✓
8	✓	✓	✓
9	✓	✓	✓
10	✓	✓	✓
11	✓	✓	✓
12	✓	✓	✓
13	✓	✓	✓
14	✓	✓	✓
15	✓	✓	✓
16	✓	✓	✓
17	✓	✓	✓

En las siguientes imágenes se puede observar la formación del óxido cuproso (rojo ladrillo) que indica la presencia de azúcares reductores en algunas de las muestras analizadas:

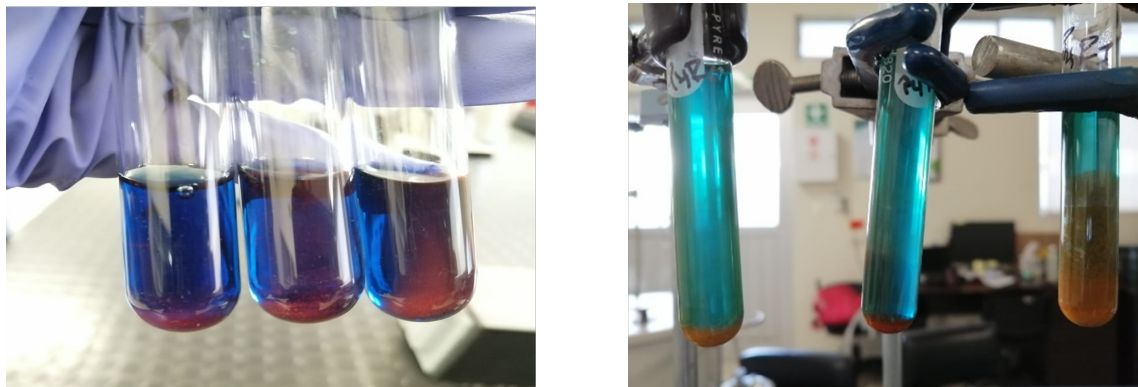


Figura 5.1: Resultado positivo del ensayo Fehling para la muestra 1 (x_1 : 0.5 M; x_2 : 30 min; x_3 : 150 rpm) (izquierda). Resultado positivo del ensayo Fehling para la muestra 2 (x_1 : 2 M; x_2 : 30 min; x_3 : 150 rpm) (derecha).

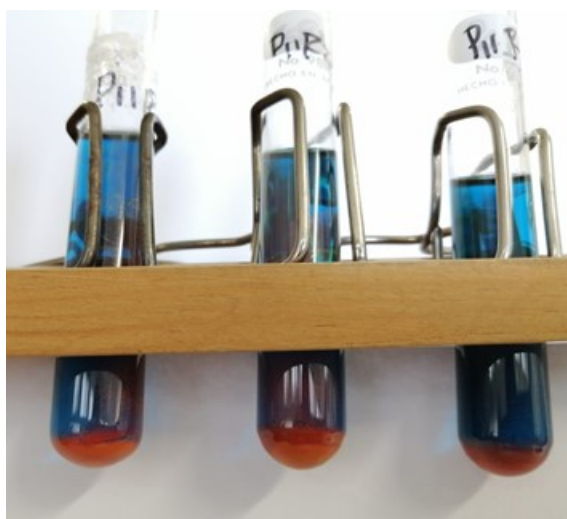


Figura 5.2: Resultado positivo del ensayo Fehling para la muestra 11 (x_1 : 1.25 M; x_2 : 75 min; x_3 : 225 rpm)

5.1.2 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE TERMINACIÓN DE AZÚCARES MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA POR EL MÉTODO FENOL-SULFÚRICO

El resultado de los azúcares totales se obtuvo mediante el análisis de espectrofotometría de mediante el método Fenol-Sulfúrico que se describió anteriormente. Para ello se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones de la solución estándar de glucosa.

A continuación, en la Tabla 5.2 se presentan las absorbancias obtenidas de cada una de las concentraciones, debido a que eran tres replicas se obtuvo el promedio y se calculó la desviación estándar y el error.

Tabla 5.2: Resultados de las absorbancias de la glucosa de referencia.

Co (mg/mL)	Abs 1	Abs 2	Abs	Abs prom	Desvprom	Error
0.1	0.077	0.072	0.075	0.0745	0.00	3.38
0.2	0.089	0.097	0.09	0.093	0.00	4.69
0.3	0.12	0.108	0.118	0.114	0.01	5.64
0.4	0.162	0.176	0.15	0.169	0.01	7.70
0.5	0.166	0.178	0.21	0.172	0.02	13.22
0.6	0.176	0.252	0.219	0.214	0.04	17.81
0.7	0.265	0.231	0.267	0.248	0.02	8.16
0.8	0.27	0.235	0.264	0.253	0.02	7.41
0.9	0.292	0.318	0.31	0.305	0.01	4.37
1	0.337	0.359	0.347	0.348	0.01	3.17

Mediante las absorbancias promedio (eje y) de cada muestra concentración de glucosa (eje x) se obtuvo la curva de calibración que se presenta a continuación en la Figura 5.3:

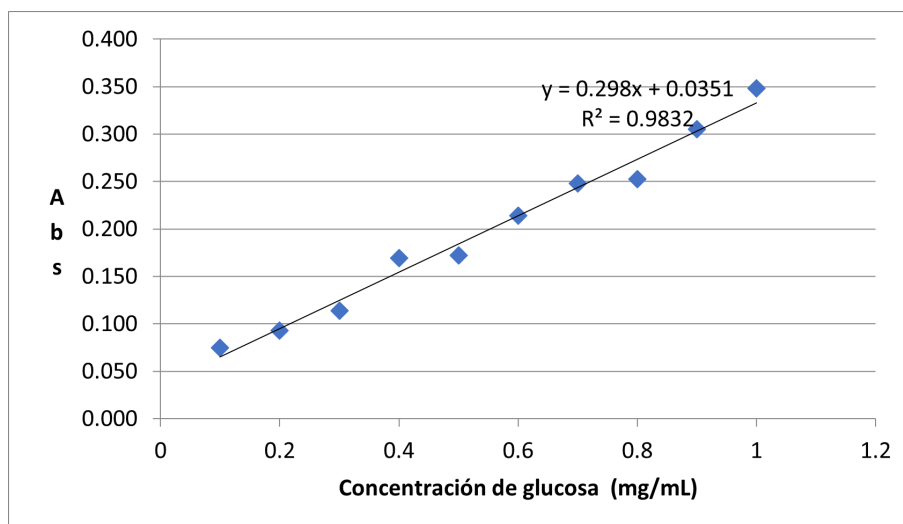


Figura 5.3: Curva de calibración de la glucosa de referencia.

De igual manera, se logró obtener la ecuación de la recta:

$$y = 0.298x + 0.0351$$

Donde:

y = absorbancia obtenida de la muestra

x = concentración de glucosa en mg/ml

Coefficiente de correlación de la glucosa con las absorbancias.

$$R^2 = 0.9832$$

Para determinar la concentración de las muestras hidrolizadas del sargazo se tomaron las absorbancias y se reemplazaron en la ecuación:

$$x = \frac{y - 0.0351}{0.298}$$

A partir de esta ecuación se obtuvieron las siguientes concentraciones de cada una de las muestras que a continuación se presentan en la Tabla 5.3:

Tabla 5.3: Resultado de las concentraciones de azúcares totales.

Muestra	Co. de Azúcares Totales (g/g de alga)
1	0.34082774
2	0.36879195
3	0.24463087
4	0.20771812
5	0.29384787
6	0.36991051
7	0.30615213
8	0.22897092
9	0.10816555
10	0.48400447
11	0.09138702
12	0.27147651
13	0.27259508
14	0.24127517
15	0.32181208
16	0.32181208
17	0.32181208

5.2 HIDRÓLISIS ÁCIDA

A partir de las concentraciones de azúcares obtenidas se realizó la optimización de la hidrólisis, por lo cual los resultados de las concentraciones se analizaron mediante el software Minitab con el RSM (Tabla 5.4) como se mencionó anteriormente.

Tabla 5.4: Resultado de las concentraciones de azúcares totales.

Muestra	Variables independientes			y_1 (g/g)
	(x_1) (M)	(x_2) (min)	(x_3) (rpm)	
1	0.5 (-1)	30 (-1)	150 (-1)	0.34082774
2	2 (1)	30 (-1)	150 (-1)	0.36879195
3	0.5 (-1)	120 (1)	150 (-1)	0.24463087
4	2 (1)	120 1	150 (-1)	0.20771812
5	0.5 (-1)	30 (-1)	300 1	0.29384787
6	2(1)	30 (-1)	300 1	0.36991051
7	0.5 (-1)	120 1	300 1	0.30615213
8	2 (1)	120 1	300 1	0.22897092
9	0.18935(- α)	75 (0)	225 (0)	0.10816555
10	2.31065 (α)	75 (0)	225 (0)	0.48400447
11	1.25 (0)	11.361 (- α)	225 (0)	0.09138702
12	1.25 (0)	138.639 (α)	225 (0)	0.27147651
13	1.25 (0)	75 (0)	118.935 (- α)	0.27259508
14	1.25 (0)	75 (0)	331.065 (α)	0.24127517
15	1.25 (0)	75 (0)	225 (0)	0.32181208
16	1.25 (0)	75 (0)	225 (0)	0.32181208
17	1.25 (0)	75 (0)	225 (0)	0.32181208

A partir de los datos procesados en el software Minitab se obtuvo la ecuación resultante, siendo un polinomio de grado dos:

$$y = 0.193 + 0.031 X_1 + 0.00255X_2 - 0.00033X_3 + 0.0335X_1 X_1 - 0.000019 X_2X_2 - 0.000000X_3X_3 - 0.00081X_1X_2 + 0.000017X_1X_3 + 0.000005X_2X_3(5.1)$$

A partir de la ecuación obtenida en Minitab se realizó un código en el software Matlab para obtener las superficies de respuesta. Mediante esto se pudo obtener el análisis de la superficie de respuesta de cada una de las variables independientes con

la variable dependiente. A continuación, se presenta la correlación de la concentración de azúcares con la concentración de reactivo, agitación y tiempo de reacción de 30 minutos (Figura 5.4). En la superficie de respuesta se puede observar que a 30 minutos de reacción existe una mayor concentración de reactivo y menor agitación la concentración de los azúcares aumentan siendo la máxima 0.4576 g/g a una concentración de 2.278 M de H_2SO_4 y una agitación de 119 rpm. De igual forma se observa que mediante la agitación aumenta la concentración de azúcares totales disminuye.

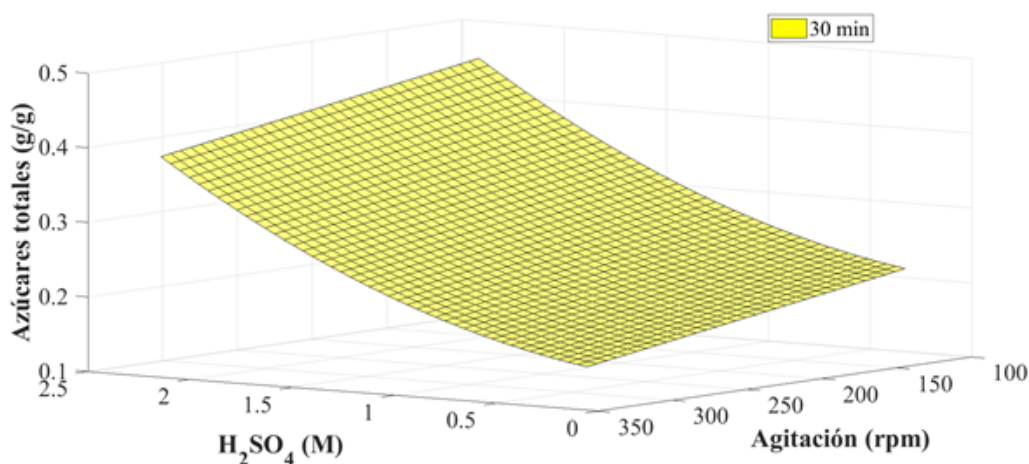


Figura 5.4: Gráfica de la superficie de respuesta para tiempo de 30 min.

En la Figura 5.5 se puede observar la gráfica del tiempo de reacción de 75 minutos, en el cual se puede apreciar un comportamiento análogo a los a 30 minutos, ya que la concentración de azúcares totales se encuentra en su punto más alto en las concentraciones del H_2SO_4 más altas y a una menor agitación. Siendo así la concentración de azúcares totales 0.4826 g/g a una concentración de H_2SO_4 de 2.278 M y una agitación de 119 rpm.

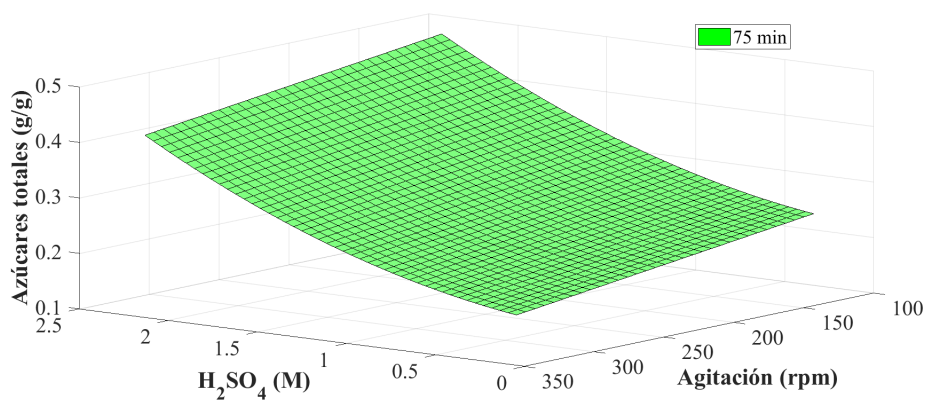


Figura 5.5: Gráfica de la superficie de respuesta para tiempo de 75 min..

Con respecto al mayor tiempo de reacción (120 minutos) la superficie de respuesta (Figura 5.6) obtenida demuestra un comportamiento similar, sin embargo, en este caso las concentraciones de azúcares totales disminuyeron, ya que el punto máximo fue 0.4306 g/g a una concentración de H₂SO₄ de 2.278 M y una agitación de 119 rpm.

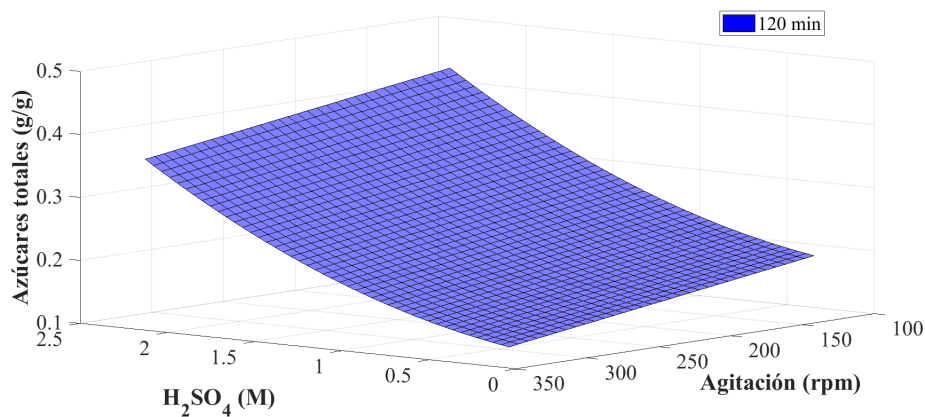


Figura 5.6: Gráfica de la superficie de respuesta para tiempo de 120 min.

Sunwoo, *et al.*, 2017, reporto comportamientos similares a los obtenidos en este estudio ya que había una disminución de monosacáridos mientras el tiempo aumentaba, debido a la formación de 5-HMF.

En general el tiempo fue la variable más influyente en la obtención de azúcares

totales, debido a que cuando este aumenta existe mayor formación de 5-HMF y una disminución de azúcares totales. Cabe mencionar que la variable de la concentración de reactivo mostró el mismo efecto en las tres superficies, indicando que a mayores concentraciones existe una mayor producción de azúcares totales, Cho *et al*, 2013, realizó un estudio con algas pardas en el cual reporta que el rendimiento de monosacárido aumentó del 29 al 42 % con el aumento de las concentraciones de ácido y disminuyó con aumentos adicionales de las concentraciones de ácido por encima de 93.0 mM.

Es importante mencionar que la agitación no influyó significativamente en la reacción, ya que no hubo aumentos considerables de azúcares totales, es decir, que la concentración de azúcares es inversamente proporcional a la agitación.

De acuerdo con las diferentes fuentes consultadas se observaron que existe una mayor concentración de carbohidratos en el *Sargassum spp.* que fue obtenido en el Caribe Mexicano en comparación con las diferentes biomazas que a continuación se destacan en la Figura 5.7.

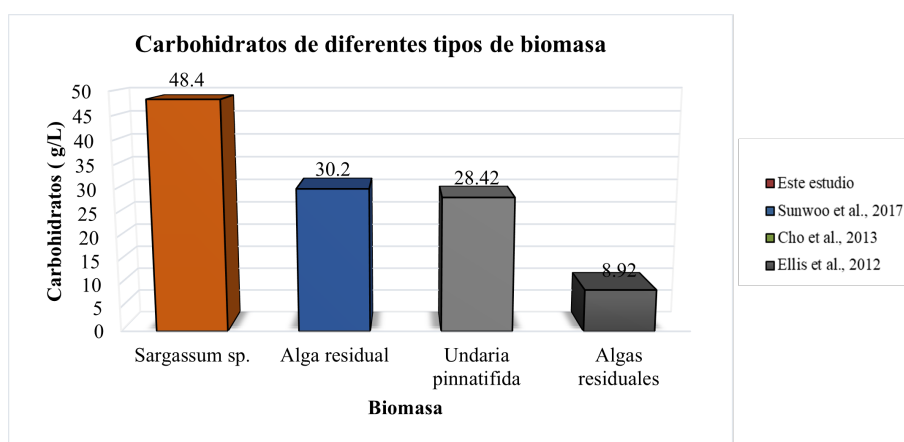


Figura 5.7: Gráfica de análisis comparativo de la concentración de azúcares de diferentes tipos de biomasa.

Con respecto a la optimización, se realizó el análisis en Minitab el cual arrojó como resultado que el punto máximo fue 0.4840 g/g de alga y realizando una pre-

dicción de respuesta múltiple que determinó el punto óptimo de las variables independientes en un tiempo de 33 minutos, una concentración de H₂SO₄ de 2.31 M y una agitación de 118 rpm (g/g) (Figura 5.8).

Optimización de respuesta: y1

Parámetros

Respuesta	Meta	Inferior	Objetivo	Superior	Ponderación	Importancia
y1	Máximo	0.0913870	0.484004		1	1

Solución

Solución	x1	x2	x3	y1 Ajuste	Deseabilidad compuesta
1	2.31065	33.2168	118.935	0.426938	0.854651

Predicción de respuesta múltiple

Variable	Valor de configuración
x1	2.31065
x2	33.2168
x3	118.935

Figura 5.8: Datos de optimización obtenidos del software Minitab.

Con las condiciones óptimas de cada variable se hizo un ajuste de la concentración máxima de azúcares totales, siendo 0.4269 g/g obtenido a 33 min, 118 rpm y 2.31 M de H₂SO₄ (Figura)

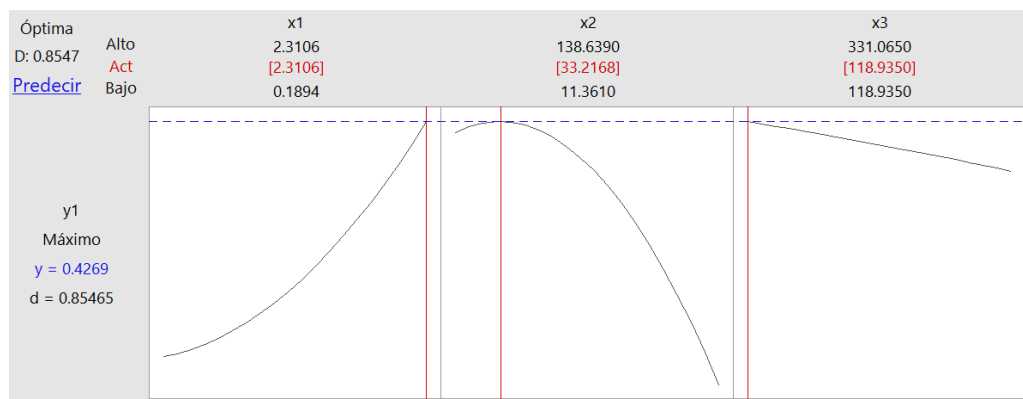


Figura 5.9: Resultados del punto óptimo de cada variable.

5.3 ANÁLISIS DE BIOETANOL

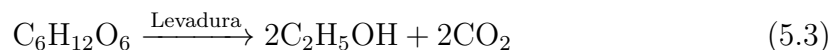
5.3.1 RENDIMIENTO TEÓRICO DEL BIOETANOL

Por otro parte, para el análisis de etanol se realizó un rendimiento teórico. De acuerdo con S. N. Naik, *et al.*, 2010, en condiciones anaeróbicas, las levaduras metabolizan la glucosa a etanol. Teóricamente, la máxima eficiencia (Ef_{max}) de conversión de glucosa en etanol es del 51 % en peso que proviene de del cálculo estequiométrico:

$$\text{Peso molecular de etanol} = 46 \text{ g/mol}$$

$$\text{Peso molecular de glucosa} = 180 \text{ g/mol}$$

$$Ef_{max} = \frac{2 * 46}{180} * 100 = 51 \quad (5.2)$$



Sin embargo, parte de la glucosa es utilizada por la levadura para la producción de masa celular y para productos metabólicos distintos del etanol, reduciendo así la eficiencia de conversión de su máximo teórico [30]. Conforme al cálculo estequiométrico de la Ef_{max} se obtuvo el rendimiento teórico del etanol, es decir, lo que se espera a obtener de bioetanol teniendo una conversión completa de los azúcares en la fermentación. En la Tabla 5.5 se puede observar el rendimiento teórico en g de etanol/ g de *Sargassum spp.* y ml de etanol/ g de *Sargassum spp.* de bioetanol.

Tabla 5.5: Resultados obtenidos del rendimiento teórico del bioetanol para cada una de las muestras estudiadas.

Muestra	Azúcares Totales (g/g)	Rendimiento teórico etanol (g/g)	Rendimiento teórico del etanol (ml/g)
1	0.34082774	0.17420085	0.22078688
2	0.36879195	0.18849366	0.23890198
3	0.24463087	0.12503356	0.15847092
4	0.20771812	0.10616704	0.13455899
5	0.29384787	0.15018891	0.1903535
6	0.36991051	0.18906537	0.23962658
7	0.30615213	0.15647775	0.19832415
8	0.22897092	0.11702958	0.14832646
9	0.10816555	0.05528461	0.07006922
10	0.48400447	0.24738006	0.3135362
11	0.09138702	0.04670892	0.05920016
12	0.27147651	0.13875466	0.17586142
13	0.27259508	0.13932637	0.17658602
14	0.24127517	0.12331842	0.15629711
15	0.32181208	0.16448173	0.20846861
16	0.32181208	0.16448173	0.20846861
17	0.32181208	0.16448173	0.20846861

Como se puede observar se obtendría hasta 31.35 mL con las siguientes condiciones de las variables independientes estudiadas, en la cual se obtuvo la concentración más alta de azúcares totales de 0.4840 g/g, en una concentración de reactivo de 2.3106 M, en un tiempo de reacción de 75 minutos y una agitación de 225 rpm.

Como los resultados sugieren el *Sargassum spp.* es una fuente recomendable

para la producción de bioetanol, debido a que casi el 48 % es convertido a AT. Es decir, de 1 g de alga se obtiene 0.48 g de azúcares. Por lo que para producir 1 L de bioetanol se necesitará de 3.18 kg de *Sargassum spp.* solo si es una conversión completa.

5.3.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES MEDIANTE TÉCNICA

HEADSPACE.

De igual manera, se determinó la presencia de etanol mediante cromatografía de gases usando la técnica headspace que anteriormente se describió. Primeramente, se realizó una calibración con la solución estándar de etanol (99.5 %) mediante la técnica headspace. Se obtuvieron los cromatogramas (Figura 54) con una coincidencia en el porcentaje de área mayor al 99 % y el tiempo de retención de 6-8 minutos para cada una de las repeticiones del análisis cromatográfico de la solución estándar (Tabla 5.6).

Tabla 5.6: Resultados obtenidos del rendimiento teórico del bioetanol para cada una de las muestras estudiadas.

No. cromatografía	Tiempo (min)	Cantidad (% de área)
1	6.16	99.59
2	6.33	88.72
3	6.39	99.03
4	7.27	99.84
5	6.39	97.15
6	6.23	99.66
7	7.31	99.84

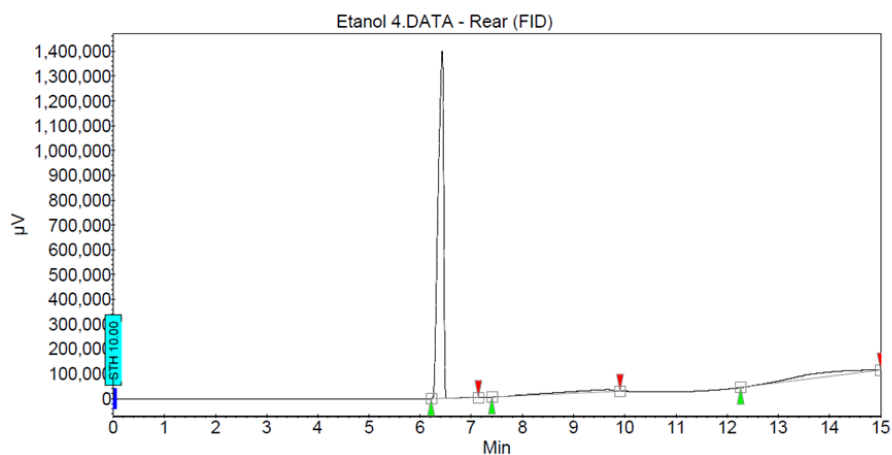


Figura 5.10: Cromatograma del etanol de referencia.

A partir de la calibración realizada se procedió a realizar las cromatografías de cada una de las muestras, obteniendo un resultado positivo que indica la presencia de etanol, en las muestras fermentadas. A continuación, se presentan dos ejemplos de los cromatogramas de dos muestras estudiadas.

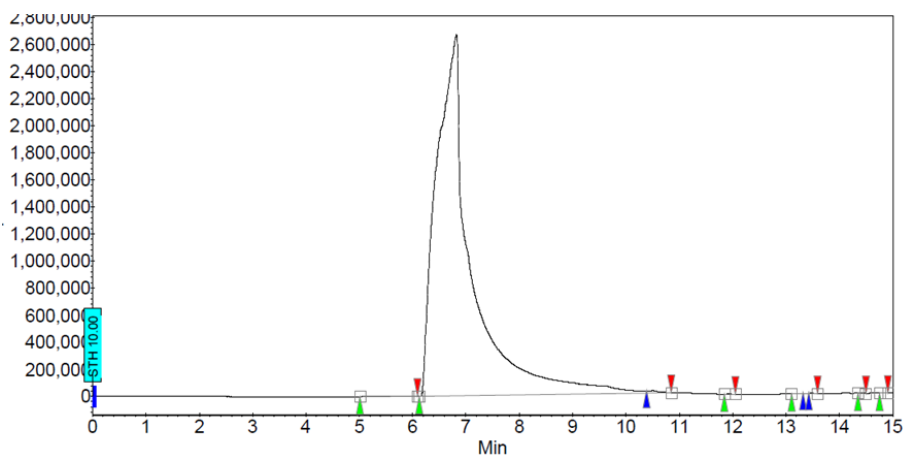


Figura 5.11: Cromatograma: Resultado positivo de la cromatografía para la muestra 11 (Concentración de reactivo: 2 M, Tiempo de reacción: 30 min, Agitación: 150 rpm).

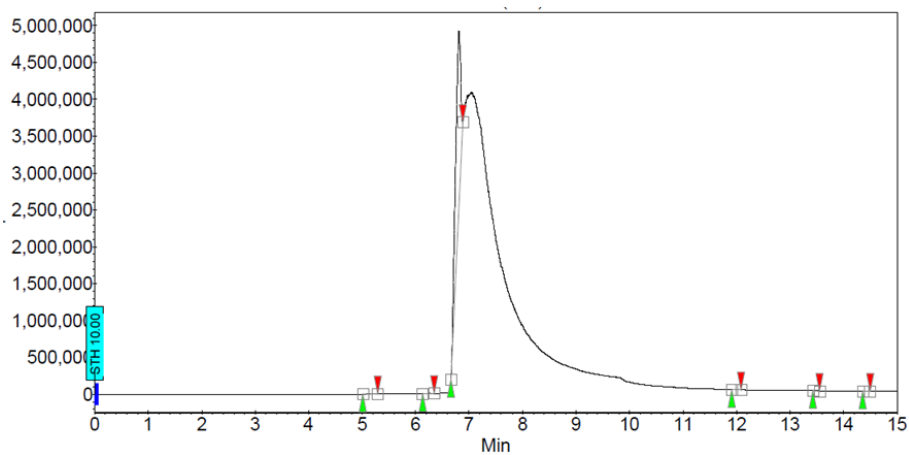


Figura 5.12: Cromatograma: Resultado positivo de la cromatografía para la muestra 11 (Concentración de reactivo: 2 M, Tiempo de reacción: 120 min, Agitación: 300 rpm).

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS

En este capítulo se presenta las conclusiones basadas en los objetivos trazados y, formuladas a partir de los resultados obtenidos en esta investigación. Del mismo modo, se plantean algunos trabajos futuros para enriquecer la investigación.

6.1 CONCLUSIONES

Fue factible determinar los parámetros y condiciones adecuadas de la hidrólisis ácida mediante el método de optimización RSM, en el cual se encontró el punto óptimo para maximizar la concentración de azúcares totales respecto a las algas pardas.

La concentración más alta de azúcares totales obtenida fue de 0.4840 g/g (48.4 g/L), en una concentración de reactivo de 2.3106 M, en un tiempo de reacción de 75 minutos y una agitación de 225 rpm. Esta concentración de AT fue mayor a los resultados previamente reportados por Sunwoo *et al.*, Cho *et al.* y Ellis *et al.*, siendo 30.2 g/L, 28.42 g/L y 8.02 g/L, respectivamente.

De las variables estudiadas, el tiempo (x_2) fue la variable que más afecto la conversión del alga a azúcares totales, puesto que a 120 minutos las concentraciones disminuían considerablemente. De acuerdo con, Sunwoo *et al.*, esto se debe a que los 5-HMF incrementan después de los 90 minutos, de modo que los monosacáridos disminuyen.

En cuanto a la variable x_1 (concentración de H_2SO_4) se concluyó que la producción de azúcares totales es proporcional al aumento del reactivo, teniendo como resultado que la mayor concentración de azúcares totales se obtuvo en 2.3106 M de H_2SO_4 , siendo la concentración más alta que se estudio en este trabajo, sin embargo, otros autores han reportado que si incrementara la concentración del H_2SO_4 podría causar una disminución de los monosacáridos.

Con respecto a la variable x_3 (velocidad de agitación) se observó que tiene mejores resultados cuando esta es menor a 120 rpm, debido a que por el tamaño de partícula de alga utilizado y el volumen de trabajo, existe una homogenización del alga con el reactivo.

De acuerdo con el análisis de Minitab el punto óptimo se encuentra en una

concentración de reactivo de H_2SO_4 de 2.31065 (M), un tiempo de reacción de 33 (min) y una agitación de 118 (rpm) con una predicción de 0.4249 g/g de azúcares totales. El tiempo fue la variable más influyente en la obtención de AT, debido a que cuando este aumenta existe mayor formación de 5-HMF y una disminución de AT.

Los resultados obtenidos sugieren que el *Sargassum spp.* es una fuente recomendable para la producción de bioetanol, debido a que casi el 48 % es convertido a AT. Es decir, de 1 g de alga se obtiene 0.48 g de azúcares. Por lo que para producir 1 L de bioetanol se necesitara de 3.18 kg de *Sargassum spp.* solo si es una conversión completa.

Es importante mencionar que el uso de *Sargassum spp.* como fuente alternativa de combustibles tiene notables beneficios ya que contribuiría a dar solución al arribo masivo de algas que se ha presentado en las costas del Caribe Mexicano, el cual se ha visto perjudicado, ambiental, social y económicamente.

6.2 FUTUROS TRABAJOS

- En este trabajo se realizó una optimización de la hidrólisis, sin embargo, después de este proceso existe una formación de inhibidores que podrían afectar la fermentación, debido a esto se recomienda realizar una optimización de la fermentación.
- Dado que en este trabajo no se determinó la concentración de bioetanol que se obtuvo en las muestras fermentadas se propone aplicar un método cuantitativo para las cromatografías.
- Realizar una optimización de hidrólisis ácida con más variables en las que podría incluirse la cantidad de biomas y la temperatura.
- Aumentar el rango de la variable de concentración de H_2SO_4 a un rango mas amplio para observar si el comportamiento de la superficie de respuesta cambia,

ya hubo literatura que reporto este tipo de comportamiento.

- En la literatura consultada se destacó que la hidrólisis enzimática se obtiene mayor concentración de azúcares comparados con la hidrólisis ácida, por lo que se propone realizar hidrólisis enzimática.
- Dado que el estudio se realizó a escala laboratorio se propone realizar el proceso de producción de bioetanol a escala reactor industrial.

APÉNDICE A

ANÁLISIS DE AZÚCARES POR EL
MÉTODO FENOL-SULFÚRICO

Preparación de la solución de fenol 5 \% P/V: se pesó 5 g de fenol y se aforó a 100 ml con agua destilada.

$$P/V = \frac{g \text{ soluto}}{ml \text{ solución}} * 100 \quad (\text{A.1})$$

$$P/V$$

$$5 \% = \frac{g \text{ soluto}}{100 \text{ ml}} * 100 \quad (\text{A.2})$$

$$g \text{ soluto} = \frac{(5 \%) (100 \text{ ml})}{100} \quad (\text{A.3})$$

$$5 \% = \frac{g \text{ soluto}}{100 \text{ ml}} * 100 \quad (\text{A.4})$$

$$g \text{ soluto} = 5 \text{ g de fenol} \quad (\text{A.5})$$

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Secretaria de Energia. Balance Naacional de Energía. 2018.
- [2] IEA. All rights reserved. World Energy Outlook. pages 23–28, 2019.
- [3] IEA. World Energy Outlook 2019 . *World Energy Outlook Sereies*, 2019.
- [4] Secretaria de Energia. 3. Prospectiva.Ener_Ren.2018-2032.pdf.
- [5] Jim Gower, Erika Young, and Stephanie King. Satellite images suggest a new Sargassum source region in 2011. *Remote Sensing Letters*, 4(8):764–773, 2013.
- [6] Mengqiu Wang, Chuanmin Hu, Brian B. Barnes, Gary Mitchum, Brian Lapointe, and Joseph P. Montoya. The great Atlantic Sargassum belt. *Science*, 364(6448):83–87, 2019.
- [7] Mengqiu Wang, Chuanmin Hu, Brian B. Barnes, Gary Mitchum, Brian Lapointe, and Joseph P. Montoya. Supplementary Materials for The great Atlantic Sargassum belt. *Science*, 364(6448):83–87, 2019.
- [8] David Freestone and Kate Killerlain Morrison. The sargasso sea. *International Journal of Marine and Coastal Law*, 27(3):647–655, 2012.
- [9] Rosa Elisa Rodríguez-Martínez, Brigitta van Tussenbroek, and Eric Jordán-Dahlgren. Afluencia masiva de sargazo pelágico a la costa del Caribe mexicano (2014-2015). *Florecimientos algales nocivos en México*, (December 2016):352–365, 2017.

- [10] Brigitta I. van Tussenbroek, Héctor A. Hernández Arana, Rosa E. Rodríguez-Martínez, Julio Espinoza-Avalos, Hazel M. Canizales-Flores, Carlos E. González-Godoy, M. Guadalupe Barba-Santos, Alejandro Vega-Zepeda, and Ligia Collado-Vides. Severe impacts of brown tides caused by *Sargassum* spp. on near-shore Caribbean seagrass communities. *Marine Pollution Bulletin*, 122(1-2):272–281, 2017.
- [11] R. E. Rodríguez-Martínez, A. E. Medina-Valmaseda, P. Blanchon, L. V. Monroy-Velázquez, A. Almazán-Becerril, B. Delgado-Pech, L. Vásquez-Yeomans, V. Francisco, and M. C. García-Rivas. Faunal mortality associated with massive beaching and decomposition of pelagic *Sargassum*. *Marine Pollution Bulletin*, 146(October 2018):201–205, 2019.
- [12] Doleasha Davis, Rachael Simister, Sanjay Campbell, Melissa Marston, Suranjana Bose, Simon J. McQueen-Mason, Leonardo D. Gomez, Winklet A. Galimore, and Thierry Tonon. Biomass composition of the golden tide pelagic seaweeds *Sargassum fluitans* and *S. natans* (morphotypes I and VII) to inform valorisation pathways, 2020.
- [13] John James Milledge, Supattra Maneein, Elena Arribas-López, and Debbie Bartlett. *Sargassum* Inundations in Turks and Caicos : Methane. *energies*, 13:1–27, 2020.
- [14] Mingxin Guo, Weiping Song, and Jeremy Buhain. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42:712–725, 2015.
- [15] Pratima Bajpai. *Advances in bioethanol*. Number 9788132215837. 2013.
- [16] Frank Rosillo-Calle and Luis A.B. Cortez. Towards proalcool II-A review of the Brazilian bioethanol programme. *Biomass and Bioenergy*, 14(2):115–124, 1998.
- [17] Yukyeong Cho, Hyejin Kim, and Sung Koo Kim. Bioethanol production from

- brown seaweed, *Undaria pinnatifida*, using NaCl acclimated yeast. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(6):713–719, 2013.
- [18] Shih Hsin Ho, Shu Wen Huang, Chun Yen Chen, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo, and Jo Shu Chang. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource Technology*, 135:191–198, 2013.
- [19] Siti Mutripah, Maria Dyah Nur Meinita, Ji Young Kang, Gwi Taek Jeong, A. B. Susanto, Romanus Edy Prabowo, and Yong Ki Hong. Bioethanol production from the hydrolysate of *Palmaria palmata* using sulfuric acid and fermentation with brewer's yeast. *Journal of Applied Phycology*, 26(1):687–693, 2014.
- [20] Siew Ling Hii, Kong Fai Lip, Yoon Tim Loh, and Ching Lee Wong. Statistical optimization of fermentable sugar extraction from the Malaysian brown alga *Sargassum binderi*. *Journal of Applied Phycology*, 27(5):2089–2098, 2015.
- [21] In Yung Sunwoo, Jung Eun Kwon, Trung Hau Nguyen, Chae Hun Ra, Gwi Taek Jeong, and Sung Koo Kim. Bioethanol Production Using Waste Seaweed Obtained from Gwangalli Beach, Busan, Korea by Co-culture of Yeasts with Adaptive Evolution. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183(3):966–979, 2017.
- [22] Mohammad Javad Hessami, Sit Foon Cheng, Ranga Rao Ambati, Yeong Hui Yin, and Siew Moi Phang. Bioethanol production from agarophyte red seaweed, *Gelidium elegans*, using a novel sample preparation method for analysing bioethanol content by gas chromatography. *3 Biotech*, 9(1):1–8, 2019.
- [23] V. Alfonsín, R. Maceiras, and C. Gutiérrez. Bioethanol production from industrial algae waste. *Waste Management*, 87:791–797, 2019.
- [24] Ganning Zeng, Hanzhang You, Kun Wang, Yuanyuan Jiang, Haijun Bao, Mingming Du, Bing Chen, Ning Ai, and Zhengrong Gu. Semi-simultaneous Saccharification and Fermentation of Ethanol Production from *Sargassum horneri* and Biosorbent Production from Fermentation Residues. *Waste and Biomass Valorization*, 11(9):4743–4755, 2020.

-
- [25] Lisbeth Olsson. *Biofuels*, volume 108. 2008.
- [26] R A Houghton and Woods Hole. Quantities of Biomass Importance. *Small*, (1990):448–453, 2008.
- [27] Ling Lin, Xianzhao Kan, Hao Yan, and Danni Wang. Characterization of extra-cellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(3):1–7, 2012.
- [28] Ashok Pandey, Christian Larroche, C. Steven Ricke, Claude-Gilles Dussap, and Edgar Gnansounou. *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes*. San Diego, USA, 1 edition, 2011.
- [29] Rawel Singh, Aditya Prakash, Bhavya Balagurumurthy, and Thallada Bhaskar. Hydrothermal Liquefaction of Biomass. *Recent Advances in Thermochemical Conversion of Biomass*, pages 269–291, 2015.
- [30] S. N. Naik, Vaibhav V. Goud, Prasant K. Rout, and Ajay K. Dalai. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2):578–597, 2010.
- [31] Liam Brennan and Philip Owende. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2):557–577, 2010.
- [32] Wai Hong Leong, Jun Wei Lim, Man Kee Lam, Yoshimitsu Uemura, and Yeek Chia Ho. Third generation biofuels: A nutritional perspective in enhancing microbial lipid production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91(April):950–961, 2018.
- [33] Mariano Martín and Ignacio Grossmann. Optimal Engineered Algae Composition for the Integrated Simultaneous Production of Bioethanol and Biodiesel. *AIChE Journal*, 59(4):2872–2883, 2013.
- [34] Yusuf Chisti. *Introduction to algal fuels*. Elsevier B.V., second edition edition, 2019.

- [35] Ira A. Levine. Algae: A way of life and health. In *Microalgae in Health and Disease Prevention*, pages 1–10. Elsevier Inc., 2018.
- [36] Ayhan Demirbas and Fatih M. Demirbas. *Alga energy. Algae as a New Source of Biodiesel*. Number 465. Springer, 2010.
- [37] Dennis J McHugh. *A guide to the seaweed industry*. 2003.
- [38] Yaser Dahman, Kashif Syed, Sarkar Begum, Pallavi Roy, and Banafsheh Moh-tasebi. *Biofuels: Their characteristics and analysis*. Elsevier Ltd, 2019.
- [39] Sandeep Sharma, Luiza Neves, Jon Funderud, Liv Torunn Mydland, Margareth Øverland, and Svein Jarle Horn. Seasonal and depth variations in the chemical composition of cultivated *Saccharina latissima*. *Algal Research*, 32(November 2017):107–112, 2018.
- [40] Richen Lin, Chen Deng, Lingkan Ding, Archishman Bose, and Jerry D. Murphy. Improving gaseous biofuel production from seaweed *Saccharina latissima*: The effect of hydrothermal pretreatment on energy efficiency. *Energy Conversion and Management*, 196(June):1385–1394, 2019.
- [41] Boris Brigljević, Jay Liu, and Hankwon Lim. Green energy from brown sea-weed: Sustainable polygeneration industrial process via fast pyrolysis of *S. Japonica* combined with the Brayton cycle. *Energy Conversion and Management*, 195(March):1244–1254, 2019.
- [42] L. S. Khuong, N. W.M. Zulkifli, H. H. Masjuki, E. Niza Mohamad, A. Arslan, M. H. Mosarof, and A. Azham. A review on the effect of bioethanol dilution on the properties and performance of automotive lubricants in gasoline engines. *RSC Advances*, 6(71):66847–66869, 2016.
- [43] LINDSAY MARGARET MARTIN. *Pelagic Sargassum and Its Associated Mobile Fauna in the Caribbean, Gulf of Mexico, and Sargasso Sea*. PhD thesis, 2016.

- [44] Oyesiku O. O. and Egunyomi A. Identification and chemical studies of pelagic masses of *Sargassum natans* (Linnaeus) Gaillon and *S. fluitans* (Borgesen) Borgesen (brown algae), found offshore in Ondo State, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 13(10):1188–1193, 2014.
- [45] Alberto Pereira-Corona. *Sargassum* spp. el recurso y el problema. *Presentado en el panel en línea: Arribazón de sargazo en el Caribe Mexicano*, Por el Planetario Cancún(11 de septiembre de 2020), <https://www.planetariodecancun.org/>.
- [46] Ok Kyung Lee and Eun Yeol Lee. Sustainable production of bioethanol from renewable brown algae biomass. *Biomass and Bioenergy*, 92:70–75, 2016.
- [47] Melih Onay. Bioethanol production via different saccharification strategies from *H. tetrachotoma* ME03 grown at various concentrations of municipal wastewater in a flat-photobioreactor. *Fuel*, 239:1315–1323, 2019.
- [48] Niyam Dave, Raja Selvaraj, Thivaharan Varadavenkatesan, and Ramesh Vinayagam. A critical review on production of bioethanol from macroalgal biomass. *Algal Research*, 42(November 2018):101606, 2019.
- [49] Kexun Li, Shu Liu, and Liu Xianhua. An overview of algae bioethanol production. *International Journal of Energy Research*, 38(8):965–977, 2014.
- [50] Priscila Herrera, Hernández Efraín, MArCIA Morales, and Irmene Ortíz. Hidrólisis ácida de biomasa lignocelulósica y algal para la obtención azúcares fermentables para la producción de etanol. *XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*, (2005):2010, 2010.
- [51] Diego Rubio, Nury Stefany Rincon Aya, and Milena Johana Torres Espitia. Evaluación de los métodos de hidrólisis ácida, hidrólisis básica y extracción mecánica para la obtención de azúcares fermentables a partir de biomasa microalgal. *Revista de Investigación*, 7(2):15–26, 2014.
- [52] Bo Zhang and Abolghasem Shahbazi. Recent Developments in Pretreatment

- Technologies for Production of Lignocellulosic Biofuels. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 02(02), 2011.
- [53] Oscar Johnny Jaramillo-Pineda. *Hidrólisis ácida de materiales lignocelulosicos y detoxificación por pervaporación*. PhD thesis, Universidad Nacional de Colombia, 2013.
- [54] Carlos Castillo-Saldarriaga and Mario Velásquez-Lozano. Producción de etanol empleando *Panicum maximum* pretratado: efecto de altas concentraciones de sólidos en la hidrólisis enzimática y fermentación de hidrólizados. *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 27(2):246–260, 2019.
- [55] R. Wright. MASS SPECTROMETRY — Gas Analysis, 2005.
- [56] PETER F. STANBURY, ALLAN WHITAKER, and STEPHEN J. HALL. An Introduction to Fermentation Processes. In *Principles of Fermentation Technology*, pages 1–11. 1995.
- [57] Reinhard Renneberg. *Biotechnología para principiantes*. Editorial Reverté, Barcelona, 1 edition, 2008.
- [58] Douglas C Montgomery. *Design and Analysis of Experiments*. 8 edition, 2012.
- [59] Cristina Gil-Martínez. Metodología de Superficie de Respuesta (RSM), 2020.
- [60] José Luis Arenas, Sosa Iván, López Sánchez. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN. 2004.
- [61] Michel Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and Fred Smith. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3):350–356, 1956.
- [62] Laura Patricia Olgún, Héctor Magadán, and M Rodríguez. Métodos en biotecnología. *Instituto de biotecnología*, pages 3–45, 2004.