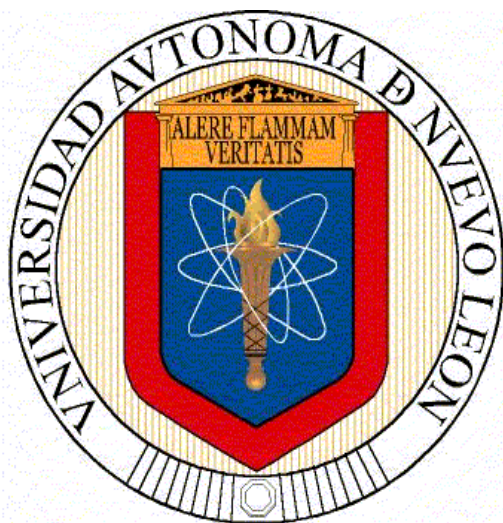


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE  
GENOTIPOS DE HIGUERILLA (*Ricinus communis* L.) PARA LA  
PRODUCCIÓN DE BIODIESEL**

**POR:**

**Ing. JAIME ARMENDÁRIZ VELÁZQUEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**NOVIEMBRE DE 2012**

# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

## **FACULTAD DE AGRONOMÍA**



### **CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE GENOTIPOS DE HIGUERILLA (*Ricinus communis* L.) PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL**

**POR:**

**Ing. JAIME ARMENDÁRIZ VELÁZQUEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**NOVIEMBRE DE 2012**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE GENOTIPOS DE  
HIGUERILLA (*Ricinus communis* L.) PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**PRESENTA:**

**Ing. JAIME ARMENDARIZ VELAZQUEZ**

**APROBACIÓN DE TESIS:**

---

**Ph. D. Francisco Zavala García**

**Asesor Principal**

---

**M.C. Eduardo Alejandro García Zambrano**

**co-Asesor**

---

**Dr. Ma. Del Carmen Ojeda Zacarías**

**co-Asesor**

## **DEDICATORIA**

**A MIS PADRES, MC JAIME ARMENDARIZ MARTINEZ Y SRA. ENRIQUETA VELAZQUEZ BRAVO, POR ENSEÑARME EL VALOR DEL TRABAJO HONESTO, LA RESPONSABILIDAD Y SOBRE TODO LA INTEGRIDAD, GRACIAS POR SU APOYO, POR SUS CONSEJOS Y SOBRE TODO POR SER QUIENES SIEMPRE HAN ESTADO A MI LADO CUANDO HE NECESITADO A ALGUIEN EN QUIÉN CONFIAR Y ME DIERA LAS FUERZAS PARA SEGUIR ADELANTE.**

**A MI HERMANO ENRIQUE, QUIEN SIEMPRE HA TENIDO LA DISPOSICIÓN Y EL GUSTO DE SER MI AYUDANTE, ASISTENTE Y AMIGO DURANTE LAS LARGAS Y DE NO SER POR SU COMPAÑÍA EN INTERMINABLES JORNADAS DE TRABAJO.**

**A CYNTHIA SOTO H. POR SER UN APOYO INCONDICIONAL DURANTE EL TIEMPO QUE HA ESTADO A MI LADO, POR SU PACIENCIA Y SOBRE TODO EL AMOR QUE ME HA DEMOSTRADO SIEMPRE.**

**A LA FAMILIA SANCHEZ-ARMENDÁRIZ, EN ESPECIAL A MIS AHIJADAS, POR SER ESA LUZ QUE ILUMINA A TODA LA FAMILIA CON SU PRESENCIA.**

**A MIS AMIGOS, A TODOS LOS QUE SIEMPRE HAN ESTADO A MI LADO Y AUN ESTANDO LEJOS ME HAN DADO SUS MUESTRAS DE CARIÑO.**

**GRACIAS A TODOS.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A DIOS, POR DARMER LA PACIENCIA Y LA ENTEREZA PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.**

**A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN, EN PARTICULAR A LA FACULTAD DE AGRONOMÍA POR BRINDARME LA OPORTUNIDAD DE REALIZAR MIS ESTUDIOS DE MAESTRÍA.**

**AL Ph.D. FRANCISCO ZAVALA GARCIA, POR SU APOYO Y LAS ENSEÑANZAS QUE ME HA BRINDADO DURANTE MI ESTANCIA EN ESTA FACULTAD.**

**AL DR. MAGIN LAPUERTA AMIGO, POR EL TIEMPO DEDICADO A MI TRABAJO, SU APOYO DURANTE MI ESTANCIA EN ESPAÑA, SOBRE TODO POR SU GRAN DISPOSICIÓN COMO PROFESOR, ADEMÁS DE DEMOSTRAR SIEMPRE SER UNA GRAN PERSONA.**

**AL M.C. EDUARDO GARCÍA ZAMBRANO Y A LA DRA. MA. DEL CARMEN OJEDA ZACARÍAS POR SU COLABORACIÓN EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.**

**A TODOS AQUELLOS QUE DE MANERA DIRECTA E INDIRECTA HAN MARCADO MI FORMACIÓN EN ESTA INSTITUCIÓN Y QUE GRACIAS A SUS COMENTARIOS, OBSERVACIONES Y CONSEJOS ME HAN AYUDADO A FORMARME PROFESIONALMENTE.**

## AGRADECIMIENTOS ESPECIALES



A la Universidad Autónoma de Nuevo León, por el apoyo brindado a través del Proyecto PAICYT-GCT012-09, “Evaluación del sorgo (*Sorghum bicolor* L.) y la higuera (*Ricinus communis* L.) como cultivos con potencial para la producción de biocombustibles en México”



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo tanto para la realización de mis estudios de posgrado como para mi estancia de trabajo en España a través del Programa Nacional de Becas Mixtas en el Extranjero



Al Dr. Magín Lapuerta Amigo, Profesor - Investigador de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de la Universidad de Castilla la Mancha, por las facilidades proporcionadas para la realización de los trabajos experimentales y teóricos en relación a la Caracterización Molecular del Biodiesel de Higuera.

## INDICE GENERAL

	PAGINA
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
AGRADECIMIENTOS ESPECIALES.....	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvii
RESUMEN.....	xviii
SUMMARY.....	xx
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos.....	5
1.2 Hipótesis.....	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1 Situación actual de la higuera en México y el mundo.....	6
2.1.1 Situación de la higuera en México.....	6
2.1.2 Situación de la higuera a nivel mundial.....	7
2.2 Clasificación taxonómica de la higuera.....	8
2.3 Características del cultivo de higuera.....	9
2.3.1 Generalidades del cultivo de higuera.....	9
2.3.2 Densidad de población.....	10
2.3.3 Características morfológicas.....	11
2.3.3.1 Características generales.....	11
2.3.3.2 Tallo.....	11
2.3.3.3 Hojas.....	12
2.3.3.4 Ramas.....	12
2.3.3.5 Fruto.....	13
2.3.3.6 Raíz.....	14
2.3.3.7 Inflorescencia.....	14
2.3.3.8 Reproducción.....	14
2.3.3.9 Semilla.....	15
2.4 Caracterización genética molecular.....	15
2.4.1 Generalidades.....	15
2.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	16
2.4.2.1 Naturalización.....	16
2.4.2.2 Apareamiento o alineamiento.....	16
2.4.2.3 Extensión.....	17
2.4.3 ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD).....	17
2.4.4 Estimación de la distancia genética.....	18

<b>2.5 Métodos de Clasificación: Análisis de Conglomerados.....</b>	<b>18</b>
2.5.1 Método de Ward.....	19
2.5.2 Método U.P.G.M.A.....	19
<b>2.6 Cultivo y producción de biodiesel a partir de higuera.....</b>	<b>19</b>
2.6.1 Suelo.....	19
2.6.2 Necesidades hídricas.....	20
2.6.3 Fertilización.....	20
2.6.4 Plagas.....	21
2.6.5 Enfermedades.....	21
2.6.6 Malezas.....	22
<b>2.7 Higuera y sus toxinas.....</b>	<b>22</b>
2.7.1 Principales toxinas presentes en la planta.....	22
2.7.2 Ricina.....	23
2.7.3 Toxicidad.....	23
<b>2.8 Producción de aceite de ricino.....</b>	<b>23</b>
2.8.1 Cosecha de semilla.....	24
2.8.2 Preparación de la semilla: secado y descascarado..	24
2.8.3 Calentamiento de las semillas.....	24
2.8.4 Prensado de las semillas.....	25
2.8.5 Extracción por solvente.....	25
2.8.6 Filtración.....	25
2.8.7 Almacenamiento de aceite.....	26
2.8.8 Características deseables.....	26
<b>2.9 Producción de biodiesel a partir de aceite de ricino.....</b>	<b>27</b>
2.9.1 Transesterificación.....	27
<b>2.10 Subproductos en la elaboración de biodiesel.....</b>	<b>28</b>
2.10.1 Torta.....	29
2.10.2 Glicerina.....	29
<b>2.11 Caracterización molecular de biocombustibles.....</b>	<b>30</b>
2.11.1 Propiedades del biodiesel y métodos evaluativos..	31
2.11.2 Contenido de metil ésteres (EN 14103).....	32
2.11.3 Contenido de mono-,di- y triglicéridos (EN 14105)..	33
2.11.4 Contenido de agua (EN ISO 12937).....	34
2.11.5 Estabilidad a la oxidación (EN14112).....	35
2.11.6 Índice de yodo (UNE 14110).....	36
2.11.7 Densidad (EN ISO 3675, EN ISO 12185).....	36
2.11.8 Viscosidad (EN ISO 3104).....	37
2.11.9 Punto de inflamación (EN ISO 3679).....	38
2.11.10 Punto de obstrucción de filtro frío (POFF) (EN 116).....	39



2.11.11 Destilación (ASTM D1160).....	40
2.11.12 Lubricidad.....	41
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
3.1 Ubicación el experimento.....	42
3.2 Obtención de germoplasma.....	42
3.3 Caracterización molecular de la higuera.....	42
3.3.1 Definición del protocolo para la caracterización molecular de la higuera.....	43
3.3.2 Caracterización molecular de la higuera utilizando la técnica de PCR-RAPD.....	45
3.4 Determinación del periodo de latencia, dinámica de emergencia y porcentaje de plantas germinadas.....	48
3.4.1 Siembra.....	48
3.4.2 Determinación del periodo de latencia.....	50
3.4.3 Determinación de la dinámica de emergencia.....	51
3.4.4 Determinación del porcentaje de plantas germinadas.....	51
3.5 Evaluación de genotipos a nivel de campo.....	51
3.5.1 Genotipos.....	51
3.5.2 Fecha de siembra y tamaño de parcela experimental.....	52
3.5.3 Prácticas de cultivo.....	53
3.5.3.1 Riego.....	53
3.5.3.2 Control de malezas.....	53
3.5.4 Toma de datos.....	53
3.5.4.1 Días a floración.....	53
3.5.4.2 Altura.....	54
3.5.4.3 Número de hojas.....	54
3.5.4.4 Tipo de fruto.....	54
3.5.4.5 Tamaño de la semilla.....	55
3.5.4.6 Características físicas del fruto.....	55
3.5.4.7 Rendimiento de semilla (kg ha <sup>-1</sup> ).....	55
3.5.4.8 Variables cualitativas.....	56
3.5.5 Extracción y producción de aceite.....	56
3.5.6 Análisis estadísticos.....	59
3.6 Producción de Biodiesel.....	61
3.7 Análisis Molecular de la Calidad del Biodiesel.....	63
3.7.1 Determinación del contenido de agua.....	63
3.7.2 Determinación de la Densidad (Experimental).....	64
3.7.3 Determinación de la Viscosidad.....	65
3.7.4 Determinación del Índice de Acidez.....	66
3.7.5 Determinación del Punto de Obstrucción de Filtro Frio (POFF).....	67

3.7.6 Determinación de la Temperatura Mínima de Estabilidad de la Mezcla.....	68
3.7.7 Determinación de la composición de Metil Esteres de Ácidos Grasos del Biodiesel (FAMES).....	70
3.7.8 Determinación de la Densidad (Teórica).....	71
3.7.9 Determinación del Índice de Yodo.....	72
3.7.10 Determinación del Peso Molécula del aceite, acido graso y biodiesel.....	73
3.7.11 Determinación de la composición atómica del biodiesel.....	74
3.7.12 Determinación del calor especifico a presión constante.....	75
3.7.13 Determinación de la Entalpia de Formación.....	76
3.7.14 Determinación de la Entalpia de Vaporización.....	77
3.7.15 Determinación del poder calorífico a presión constante.....	81
3.7.16 Determinación del poder calorífico a volumen constante.....	82
3.7.17 Determinación del numero de cetano.....	84
3.7.18 Dosado Estequiométrico.....	85
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>87</b>
4.1 Colecta de Semilla.....	87
4.2 Diferenciación Molecular.....	89
4.2.1 Determinación del protocolo para la caracterización molecular por medio de la técnica de RAPD.....	89
4.2.2 Diferenciación genética de las colectas.....	95
4.2.2.1 Iniciador OPA.....	95
4.2.2.2 Iniciador OPG.....	103
4.2.2.3 Análisis de clúster y clasificación en base a los resultados de la técnica RAPD.....	110
4.3 Caracterización morfológica.....	113
4.3.1 Variables climatológicas presentes durante el ensayo.....	113
4.3.2 Determinación del Periodo de Latencia, Dinámica de Germinación y Porciento de Plantas Germinadas.....	114
4.3.2.1 Periodo de Latencia.....	114
4.3.2.2 Dinámica de Emergencia.....	116
4.3.2.3 Porciento de Plantas Germinadas.....	117
4.3.3 Días a Floración.....	118
4.3.4 Numero de Hojas.....	120
4.3.5 Altura de Planta.....	122
4.3.6 Relación entre altura y días a floración.....	124
4.3.7 Relación entre días a floración y numero de hojas....	125

4.3.8 Tipo de Fruto.....	125
4.3.9 Largo y ancho de semilla.....	127
4.3.10 Relación entre largo y ancho de semilla.....	130
4.3.11 Tamaño de inflorescencia.....	131
4.3.12 Numero de Frutos por Inflorescencia.....	133
4.3.13 Relación entre largo de inflorescencia y número de frutos.....	134
4.3.14 Características físicas del fruto.....	136
4.3.15 Producción de semilla y aceite.....	139
4.3.15.1 Producción de semilla.....	139
4.3.15.2 Contenido de aceite.....	142
4.3.16 Color de Tallo, Hoja y Nervadura.....	145
4.3.17 Diferenciación en base a la morfología de la higuerilla.....	147
4.4 Producción de Biodiesel.....	150
4.4.1 Determinación del protocolo de Transesterificación.....	150
4.4.2 Producción de biodiesel a partir del aceite producido.....	153
4.5 Análisis molecular de Calidad de Biodiesel.....	157
4.5.1 Contenido de Agua.....	157
4.5.2 Densidad.....	159
4.5.3 Viscosidad.....	160
4.5.4 Viscosidad cinemática de mezclas biodiesel-diesel..	162
4.5.5 Índice de Acidez.....	164
4.5.6 Punto de Obstrucción de Filtro Frio (POFF).....	166
4.5.7 Definición de la temperatura mínima de estabilidad de las mezclas de biodiesel.....	169
4.5.8 Determinación de FAMES.....	170
4.5.9 Densidad Teórica.....	173
4.5.10 Índice de Yodo.....	175
4.5.11 Peso molecular del aceite, ácidos grasos y biodiesel.....	176
4.5.12 Composición atómica del biodiesel.....	177
4.5.13 Calor Especifico a Presión Constante.....	178
4.5.14 Entalpia de Formación.....	179
4.5.15 Entalpia de Vaporización.....	180
4.5.16 Poder Calorífico.....	182
4.5.17 Numero de Cetano.....	184
4.5.18 Dosado Estequiométrico.....	185
5. CONCLUSIONES.....	187
6. BIBLIOGRAFÍA.....	189
7. ANEXOS.....	202

## INDICE DE CUADROS

Cuadro	Titulo	Pagina
1	Principales productores de higuera a nivel mundial.....	8
2	Características del aceite de ricino.....	26
3	Reactivos utilizados en la técnica de PCR.....	44
4	Series de iniciadores utilizadas para la diferenciación molecular del material genético y sus diferentes secuencias.....	46
5	Tabla de ANAVA de un diseño de bloques completos al azar.....	60
6	Contribución de los distintos grupos para el cálculo de $T_e$ , $T_c$ y $P_c$ .....	78
7	Colectas realizadas en el estado de Nuevo León y su posicionamiento geográfico.....	87
8	Concentraciones de ADN obtenido utilizando el Kit comercial MasterPure™ Plant Leaf DNA.....	89
9	Relación 260/280 de las diferentes muestras de ADN.....	90
10	Numero de carril y contenido de los diferentes geles elaborados para la caracterización molecular.....	95
11	Variables climáticas reportadas en Marín N.L. durante el periodo de abril-diciembre del año 2011.....	113
12	Periodo de Latencia de las diferentes colectas de higuera.....	114
13	Análisis de varianza y Coeficiente de Variación de la variable días a floración.....	119
14	Prueba Tukey para la comparación de medias de la variable días a floración.....	119
15	Análisis de varianza y Coeficiente de Variación de la variable numero de hojas.....	120
16	Prueba Tukey para la comparación de medias de la variable numero de hojas a la primera floración.....	121
17	Análisis de varianza y Coeficiente de Variación de la variable altura de planta.....	122
18	Prueba Tukey para la comparación de medias para la variable altura de planta.....	122
19	Porcentaje de frutos dehiscentes de cada una de las colectas de higuera analizadas.....	126
20	Análisis de varianza y Coeficiente de Variación de las variables largo y ancho de semilla.....	127
21	Prueba Tukey para la comparación de medias para la variable ancho de semilla.....	128

22	Prueba Tukey para la comparación de medias para la variable largo de semilla.....	128
23	Análisis de varianza y Coeficiente de Variación para la variable tamaño de inflorescencia.....	131
24	Prueba Tukey para la comparación de medias para la variable tamaño de inflorescencia.....	131
25	Análisis de varianza y Coeficiente de Variación para la variable numero de frutos por inflorescencia.....	133
26	Prueba Tukey para la comparación de medias de la variable frutos por inflorescencia.....	133
27	Porcentaje de individuos con frutos espinosos y cutícula persistente.....	136
28	Análisis de varianza y Coeficiente de Variación para la variable porcentaje de individuos con frutos espinosos (%FE) y cutícula persistente (%FCP).....	137
29	Prueba Tukey para la comparación de medias de la variable porcentaje de individuos con cutícula persistente.....	138
30	Análisis de varianza y Coeficiente de Variación de la variable producción de semilla.....	139
31	Prueba Tukey para la comparación de medias para la variable producción de semilla.....	139
32	Análisis de varianza y Coeficiente de Variación de la variable producción de aceite.....	142
33	Prueba Tukey para la comparación de medias de la variable producción de aceite.....	143
34	Color de tallo, nervadura y hoja de los distintos genotipos de higuierilla.....	145
35	Grupos formados en la diferenciación morfológica y sus principales características.....	148
36	Concentración de aceite, metanol y catalizador para la transesterificación del aceite comercial de higuierilla a temperatura constante (60°C).....	151
37	Pruebas de transesterificación utilizando KOH como catalizador.....	153
38	Genotipos, cantidad de aceite, alcohol (metanol), catalizador (NaOH), % w/w utilizados para la producción de biodiesel.....	153
39	Producción de biodiesel de las diferentes colectas evaluadas....	154
40	Contenido de agua de las 12 diferentes muestras de biodiesel...	158
41	Densidad de las 12 muestras de biodiesel de ricino.....	159

42	Viscosidad cinemática de las 12 muestras de biodiesel de ricino.....	160
43	Viscosidad cinemática de las muestras B05, B10, B15 y B20....	162
44	Índice de acides de las 12 diferentes muestras de biodiesel puro de ricino.....	164
45	Análisis de varianza del % de FAMEs de las diferentes muestras de biodiesel.....	172
46	Densidad calculada y densidad experimental de las diferentes muestras de biodiesel de ricino.....	174
47	Índice de yodo de las 12 muestras de biodiesel de ricino disponibles.....	175
48	PM (kg/kmol) del aceite, ácido y biodiesel de las 12 muestras disponibles.....	176
49	Numero de átomos y % m/m de C, H y O que conforman las diferentes muestras de biodiesel.....	177
50	Coefficientes del polinomio que define $c_p$ y el valor de delta H para cada una de las diferentes muestras de biodiesel.....	178
51	Factor acéntrico crítico, $\gamma$ de las 12 diferentes muestras de biodiesel analizadas.....	181
52	$PCI_p$ y $PCS_v$ de las 12 diferentes muestras de biodiesel.....	182
53	Numero de Cetano de las 12 diferentes muestras de biodiesel...	184
54	Dosado relativo de las 12 muestras de biodiesel.....	185

## INDICE DE FIGURAS

Figura	Titulo	Pagina
1	Área cultivada y producción de semilla de higuera en México.....	7
2	Tallo de una planta de higuera joven.....	11
3	Hoja de una planta de higuera.....	12
4	Crecimiento de ramas en una planta de higuera.....	13
5	Semilla y fruto de una planta de higuera originaria del estado de Nuevo León.....	13
6	Inflorescencia de una planta de higuera originaria del estado de Nuevo León.....	14
7	Proceso de transesterificación.....	28
8	Grafica de Posición de Pixeles utilizada para la definición de marcadores moleculares.....	47
9	Realización de la primera siembra.....	49
10	Plantas utilizadas para la determinación de dinámica de germinación.....	50
11	Daño provocado por el frío en las plántulas de higuera.....	50
12	Siembra de higuera en campo.....	52
13	Croquis de distribución de las unidades experimentales en el terreno.....	52
14	Yema apical que muestra el momento del inicio de la floración.....	54
15	Medición de las dimensiones de las semillas.....	55
16	Distintos tipos de color de tallo; verde (1), rojo (2) y mixto (3).....	56
17	Proceso de molienda de las semillas de higuera.....	57
18	Proceso de agitación con metanol de las semillas previamente molidas.....	57
19	Proceso de filtración del metanol y aceite en dilución.....	58
20	Proceso de evaporación de metanol.....	58
21	Bioreactor para la producción del biodiesel.....	62
22	Separación de fases al final del proceso de transesterificación.....	62
23	Aparato coulombimétrico utilizado para la determinación del contenido de agua.....	63
24	Baño de temperatura regulada utilizado para la determinación de la densidad.....	64
25	Areómetro dentro de la muestra previo a la lectura de la densidad.....	65

26	Viscosímetro de Ostwald utilizado para la determinación de la viscosidad cinemática.....	66
27	Titulador utilizado para la determinación del índice de acidez.....	67
28	Analizador automático del punto de obstrucción de filtro frío utilizado.....	68
29	Baño con refrigerante utilizado para disminuir la temperatura de las muestras.....	69
30	Analizador TURBISCAN utilizado para el análisis.....	69
31	Cromatógrafo de gases utilizado para la determinación de FAMES.....	70
32	Colecta realizada en el estado de Nuevo León.....	88
33	Colecta realizada en el estado de San Luis Potosí.....	88
34	Gel elaborado con material genético del estado de México y los 20 distintos iniciadores OPA (1-OPA01, 2-OPA02... 20-OPA20), testigo positivo (P), testigo negativo (N) y marcador (M).....	91
35	Gel elaborado con material genético del estado de Chihuahua y los 20 distintos iniciadores OPA (1-OPA01, 2-OPA02... 20-OPA20), testigo positivo (P), testigo negativo (N) y marcador (M).....	92
36	Gel elaborado con material genético del estado de México y los 20 distintos iniciadores OPG (1-OPG01, 2-OPG02 20-OPA20), testigo positivo (P), testigo negativo (N) y marcador (M).....	93
37	Gel elaborado con material genético del estado de Chihuahua y los 20 distintos iniciadores OPG (1-OPG01, 2-OPG02... 20-OPA20), testigo positivo (P), testigo negativo (N) y marcador (M).....	93
38	Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPA01 (carriles 2-19) y OPA02 (carriles 20-37)...	96
39	Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPA03 (carriles 2-19) y OPA04 (20-37).....	96
40	Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPA05 (carriles 2-19) y OPA06 (20-37).....	97
41	Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPA07 (carriles 2-19) y OPA08 (20-37).....	98
42	Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPA09 (carriles 2-19) y OPA10 (20-37).....	98
43	Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPA11 (carriles 2-19) y OPA12 (20-37).....	99



44	Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPA13 (carriles 2-19) y OPA14 (20-37).....	100
45	Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPA15 (carriles 2-19) y OPA16 (20-37).....	1001
46	Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPA17 (carriles 2-19) y OPA18 (20-37).....	1001
47	Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPA19 (carriles 2-19) y OPA20 (20-37).....	102
48	Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPG01 (carriles 2-19) y OPG02 (20-37).....	103
49	Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPG03 (carriles 2-19) y OPG04 (20-37).....	104
50	Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPG05 (carriles 2-19) y OPG06 (20-37).....	104
51	Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPG07 (carriles 2-19) y OPG08 (20-37).....	105
52	Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPG09 (carriles 2-19) y OPG10 (20-37).....	106
53	Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPG11 (carriles 2-19) y OPG12 (20-37).....	106
54	Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPG13 (carriles 2-19) y OPG14 (20-37).....	107
55	Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPG15 (carriles 2-19) y OPG16 (20-37).....	108
56	Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPG17 (carriles 2-19) y OPG18 (20-37).....	108
57	Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPG19 (carriles 2-19) y OPG20 (20-37).....	109
58	Dendrograma del análisis en clúster de los 18 genotipos de higuera utilizados.....	111
59	Hojas primarias de la higuera.....	115
60	Dinámica de emergencia de las diferentes colectas de higuera.....	115
61	Porcentaje de plantas germinadas.....	117
62	Modelo de regresión para altura de planta y días a floración.....	124
63	Modelo de regresión entre las variables número de hojas y días a floración.....	125
64	Modelo de regresión entre las variables largo y ancho de semilla.....	130

65	Modelo de regresión entre las variables largo de inflorescencia y numero de frutos.....	135
66	Producción de semilla de las 17 colectas de higuierilla utilizadas en el ensayo.....	140
67	Producción total de aceite por hectárea.....	144
68	Dendrograma de clasificación morfológica de las 17 colectas de higuierillas.....	147
69	Separación de fases del biodiesel producido con aceite de maíz.....	150
70	Prueba 6 de transesterificación de aceite de higuierilla.....	151
71	Separación de fases de la prueba 7.....	152
72	Separación de fases del biodiesel producido.....	155
73	Primer lavado con agua del biodiesel producido.....	156
74	Ultimo lavado del biodiesel para la eliminación de residuos.....	157
75	Evaporación de agua y clarificación del biodiesel.....	163
76	Viscosidad cinemática de las mezclas B05, B10, B15, B20 y B100 de biodiesel de ricino.....	166
77	POFF de las diferentes mezclas diesel-biodiesel.....	167
78	POFF de las mezclas B05, B10, B15 y B20.....	168
79	Diferencias entre la medición de POFF sin agitación y con agitación.....	169
80	Grafica de transmisión de luz a través de la muestra B05 a 2°C.....	170
81	Grafica de transmisión de luz a través de la muestra B05 a 4°C.....	171
82	% De éster metílico de acido ricinoléico contenido en las diferentes muestras de biodiesel.....	171
83	% De esteres metílicos contenidos en las diferentes muestras de biodiesel.....	179
84	Desarrollo de $c_p$ en relación a la temperatura.....	180
85	Desarrollo de $hf$ en relación a la temperatura.....	181
86	Evolución de la $\Delta h_v^0 \left( \frac{kJ}{kg} \right)$ con respecto a la temperatura.....	

## RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo fueron realizar una caracterización morfológica y molecular de la Higuierilla (*Ricinus communis* L.) y de la calidad del biocombustible producido a base del aceite obtenido de la semilla, con el fin de conocer el comportamiento de esta planta como un cultivo agroenergético viable para la región noreste del México. Se utilizaron 17 colectas del estado de Nuevo León, 11 colectas de San Luis Potosí, una colecta de Michoacán y dos muestras obtenidas con particulares procedentes del estado de Chihuahua y una más del Estado de México. La caracterización molecular se llevo a cabo utilizando la técnica de RAPDs, para la cual se utilizaron las series OPA (01-20) y OPG (01-20), como resultado se obtuvieron un total de 725 productos de amplificación, de los cuales 326 (44.96%) fueron productos de amplificación aptos para ser considerados como marcadores y 249 (55.04%) que presentaron una baja calidad, por lo cual no fueron considerados como marcadores. Se estimo el Índice de Diversidad el cual fue de 0.903. Se elaboró una matriz binaria para llevar a cabo el análisis de conglomerados con los datos obtenidos de la caracterización molecular. El análisis resultó en un dendrograma, el cual dio la formación de tres grupos, el primero de ello conformado por las colectas C1M1, C1M3, Chi02, SLP05, SLP06, C2M6, Chi01, SLP02, SLP04, C2M4 y SLP11, el cual agrupa plantas de higuierilla de porte más bajo, con una cantidad media de hojas y con inflorescencias largas, el segundo grupo se conformo de las colectas C1M6, C2M1, SLP09, C2M7, SLP10, este cluster agrupa colectas de porte medio, con una gran cantidad de hojas y una cantidad de frutos por inflorescencia y finalmente el tercer grupo se conformo por las colectas Mich y EdoMex, dicho grupo se encuentra conformado por las colectas que

promediaron una mayor altura a la floración, un menor promedio de hojas semillas más grandes y un bajo promedio en relación al largo de la inflorescencia. Para la caracterización morfológica se utilizaron 17 materiales (siete del estado de Nuevo León, siete del estado de San Luis Potosí, dos del estado de Chihuahua, una del estado de Michoacán y una del estado de México). Se midieron las variables: dinámica de emergencia, días a floración, número de hojas, altura, tipo de fruto, tamaño de la semilla, tamaño de la inflorescencia, número de frutos por inflorescencia, características físicas del fruto, color del tallo, hoja y nervadura, producción de semilla y producción de aceite. Como resultado de la evaluación y caracterización morfológica, se realizó un análisis de conglomerados que resultó en un dendrograma que facilitó la clasificación de los diferentes genotipos, formándose tres grupos homogéneos, el primero de ellos integrado por las colectas SLP10, SLP06, Chi02 y C1M6, el segundo integrado por las colectas SLP5, SLP04, EdoMex y C2M7 y el tercero por las colectas SLP03, SLP02, C2M1, Chi01, SLP11, C2M6, C1M3 C2M4 y C1M1. Además, se detectó que los mejores genotipos en cuanto a producción de semilla fueron C1M6, Chi02 y SLP06, los cuales produjeron  $970 \text{ kg ha}^{-1}$ ,  $937.07 \text{ kg ha}^{-1}$  y  $724.46 \text{ kg ha}^{-1}$ , respectivamente. La producción de biodiesel se llevo a cabo a partir del aceite extraído de las diferentes colectas, se encontró que el rendimiento de biodiesel fue en promedio de 1:0.84, lo que significa que por cada gramo de aceite transesterificado se obtuvieron 0.84g de biodiesel. Finalmente, el biodiesel obtenido se caracterizo y se evaluó siguiendo las normas de la Asociación Española de Normalización (AENEOR) vigentes, concluyendo que el biodiesel obtenido, en general no cumple con dichas normas utilizándolo puro, pero disuelto, el diesel puede ser una buena alternativa como biocombustible.

Palabras clave: Diversidad, genética, diferencias morfológicas, Biodiesel, Caracterización Molecular.

## SUMMARY

The objectives of this study were to assess morphological and molecular characterization of Castor (*Ricinus communis* L.) and the quality of biofuel produced from oil obtained from the seed, in order to understand the behavior of this plant as a agroenergy crop viable for the northeast region of Mexico. 17 collections were used from the state of Nuevo León, 11 collections of San Luis Potosi, a collection of Michoacán and two individual samples obtained from the state of Chihuahua and Mexico State more. Molecular characterization was carried out using the RAPD technique, which used the series OPA (01-20) and OPG (01-20), being obtained a total of 725 amplification products, of which 326 (44.96%) were suitable amplification products to be considered as markers and 249 (55.04%) with a low quality and therefore were not considered as markers. We estimated the Diversity Index which was 0.903. The analysis resulted in a dendrogram, which gave the formation of three groups, the first composed it C1M1 collections, C1M3, Chi02, SLP05, SLP06, C2M6, CHI01, SLP02, SLP04, SLP11 C2M4 and which groups plants castor consignment lower, with an average amount of leaves and fruits per inflorescences , the second group was formed by collections C1M6, C2M1, SLP09, C2M7, SLP10, this cluster comprises collections of medium size, with a lot of leaves and a medium number of fruits per inflorescence and finally the third group was formed by the collections EdoMex and Mich, that group is made up of collections that averaged greater height at flowering, leaves lower average larger seeds and a low average in relation to the length of the inflorescence. The morphological characterization were used 17 materials (seven of the state of Nuevo Leon, seven of the state of San Luis Potosi, two Chihuahua state, a state of Michoacan and Mexico State). Variables were measured: dynamic emergence, days to flowering, number of leaves, height, type of fruit, seed size, inflorescence size, number of fruits per inflorescence, physical characteristics of the fruit, stem color, leaf and rib, seed production and oil production. As a result

of the evaluation and morphological characterization, we performed a cluster analysis resulted in a dendrogram that facilitated the classification of different genotypes, forming three homogeneous groups, the first formed by the collections SLP10, SLP06, and C1M6 Chi02, the second consisting of collections SLP5, SLP04, and C2M7 EdoMex and the third by the collections SLP03, SLP02, C2M1, CHI01, SLP11, C2M6, C1M3 C2M4 and C1M1. Furthermore, it was found that the best genotypes in terms of seed production were C1M6, Chi02 and SLP06, which produced  $970 \text{ kg ha}^{-1}$ ,  $937.07 \text{ kg ha}^{-1}$  and  $724.46 \text{ kg ha}^{-1}$ , respectively. Biodiesel production was carried out from the oil extracted from the various collections; it was found that the yield of biodiesel averaged 1:0.84, which means that for every gram of oil transesterified was obtained 0.84g of biodiesel. Finally, the biodiesel obtained was characterized and evaluated according to the rules of the Spanish Association for Standardization (AENEOR), concluding that the biodiesel obtained generally does not meet these standards using it pure, but dissolved, the diesel can be a good alternative as biofuel, making blends in different concentrations.

Keywords: Diversity, genetic, morphological, Biodiesel, Molecular Characterization.

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el cambio climático ha obligado a las sociedades a buscar alternativas que ayuden a disminuir el consumo de combustibles fósiles y las emisiones de CO<sub>2</sub>. Existen diversos cultivos agroenergéticos que pueden utilizarse en la producción de biocombustibles; la higuera por ejemplo, la semilla posee un alto contenido de aceite (hasta el 50%) que puede utilizarse para la producción de biodiesel, en tanto que el sorgo dulce y la caña de azúcar, utilizan para la producción de bioetanol el jugo, cuya característica principal es el alto contenido de azúcares. Considerando la demanda del biodiesel y la rusticidad y diversidad de ambientes donde se desarrolla, la higuera puede considerarse un cultivo con alto potencial para México y en particular para la región noreste del país (Navas, 2008).

En la actualidad, México consume alrededor de 330 mil barriles por día de diesel, en cuanto a biodiesel no existen estadísticas sobre su consumo, pero existen proyecciones donde consideran una demanda máxima de 77 millones de barriles de biodiesel al año, considerando que este sustituyera el 20% del diesel consumido para el año 2012 (IICA, 2010).

La higuera es una planta originaria de África, pero se ha cultivado alrededor del mundo en diversos tipos de climas, como subtropicales, tropicales y áridos. Una característica importante es que puede fecundarse por autopolinización y también por polinización cruzada; diversos estudios a nivel mundial indican que existe una diversidad genética muy baja entre el germoplasma de higuera (Chan *et al.*, 2010).

En México, la siembra de higuera no supera las 500 hectáreas (2009), con una producción de 100 toneladas aproximadamente (FAOSTAT, 2010).

La higuera es una planta herbácea con un gran desarrollo radicular, lo cual le permite un buen desarrollo en épocas de sequía en zonas áridas y semiáridas; bajo esquemas de producción de temporal, se necesita una precipitación mínima de 600 mm de lluvia. Se trata además de una planta con inflorescencia tipo panícula terminal, las flores masculinas generalmente están ubicadas en la base del raquis y las femeninas se encuentran en la parte superior; las hojas son grandes, palmatolobadas de margen dentado y largamente pecioladas pero no muy numerosas variando su tamaño de los 6 a los 60 cm de largo (Mazzani, 2007).

Para su desarrollo óptimo, la planta requiere de luz directa, por lo cual debe evitarse el sombreado; además, su desarrollo se ve afectado por la presencia de altas concentraciones de aluminio. En cuanto a la fertilización, se recomienda una aplicación de nitrógeno de 55 kg ha<sup>-1</sup>, de fósforo a razón de 75 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y 55 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O. Durante el desarrollo temprano de la planta puede ser susceptible a la competencia con malezas, principalmente debido a la dormancia que presenta (hasta 20 días de demora para su emergencia). Bajo condiciones de cultivo puede ser susceptible a diversas plagas como gusanos trozadores (*Agrotis* spp.) y chinches de encaje y enfermedades producidas por hongos (*Tricoderma* spp.). A temperaturas mayores de 40°C se puede provocar el aborto de las flores y la disminución sustancial de aceite (Franco, 2008; Navas, 2008; Córdoba, 2008; Londoño, 2008, Saldarriaga, 2008).

Tradicionalmente, la caracterización de las plantas se hace a través de características morfológicas de diversas estructuras, como frutos, hojas, semillas y polen; en el caso de higuera, Shaheen (2002) realizó un estudio morfológico de esta planta en diversas regiones de la cuenca del río Nilo, encontrando diferencias significativas entre regiones.

En los últimos años, el objetivo de cualquier estudio de diversidad genética es utilizar el método de marcadores moleculares, que provea la máxima cantidad de información con la menor inversión de tiempo y dinero. Una de las maneras



de determinar la diversidad en los bancos de germoplasma es la aplicación de métodos basados en la genética, que a su vez envuelven métodos basados en marcadores proteicos como isoenzimas o marcadores del ADN, tales como las derivadas de las técnicas de RAPDs, AFLPs, ISSRs y SSRs (Allan *et al.*, 2008).

Debido a las características de la higuierilla en cuanto al porcentaje de aceite en la semilla, su gran adaptabilidad y la facilidad en la transformación de su aceite, sitúan a este cultivo con un alto potencial para la producción industrial de biodiesel, aunado a que este no compite con las necesidades alimentarias y para su producción pueden utilizarse tierras marginales (Navas, 2008).

Un importante obstáculo para el cultivo de la higuierilla es su alto contenido de ricina, una proteína extremadamente tóxica que se encuentra dentro de las semillas; se considera como uno de los venenos naturales más mortales cuando se administra de manera intravenosa o inhalado en forma de partículas finas. La actividad bioquímica de la ricina se caracteriza como una proteína del tipo 2, que inhibe el ribosoma (RIP) y está compuesto de dos subunidades: Toxina A y Toxina B. La relativa facilidad con que puede purificarse la ricina ha sido considerada en Estados Unidos como un arma biológica, por lo cual se produce en pequeñas cantidades en este país (Chan *et al.*, 2010).

La extracción del aceite de ricino se realiza mediante calentamiento y prensado en máquinas especiales (expeler), que mediante presión extraen el aceite de la materia seca; alrededor del 10% del aceite debe ser extraído por medio de solventes, el subproducto resultante de la extracción puede utilizarse como fertilizante. Finalmente, el aceite es refinado dándole las características específicas que el mercado demanda (CEDRS, 2006).

El aceite de ricino o castor que se extrae de las semillas de la higuierilla, tiene como componente principal el ácido ricinoleico, el cual forma parte de un triglicérido simple denominado triricinoleina; se trata de un aceite altamente viscoso y de bajo punto de solidificación. La transformación del triglicérido en

biodiesel se realiza a través de un proceso llamado transesterificación (Benavides *et al.*, 2007)

La transesterificación consiste en la reacción entre triglicéridos y alcoholes de cadena corta en presencia de un catalizador, el cual puede ser ácido o básico, dando como resultado la producción de aquil esteres y glicerina, esta debe ser separada (ya sea por gravedad o centrifugación) pudiendo ser purificada y reutilizada posteriormente en otros procesos (García-Cota *et al.*, 2009).

Benavides *et al.* (2007) reportaron que los mayores rendimientos de biodiesel a base de semilla de higuierilla obtenido mediante el método de metanólisis, se dan bajo condiciones de temperatura ambiente, una relación de metanol/aceite de 9 y un porcentaje de 0.8% en peso de NaOH. El biodiesel obtenido presentó un incremento en el consumo específico de combustible, el rendimiento del motor no presentó afectación con el uso de biodiesel. Una vez procesado el aceite y transformado en biodiesel puede utilizarse en el orden de 15% de biodiesel y el resto de diesel convencional, manteniendo así los estándares de calidad internacionales.

Además, se ha demostrado que la hidrolisis del bagazo (torta proteica) residual del proceso de extracción de provoca una disminución en su toxicidad; asimismo, tomando en cuenta una alta eficiencia en sacarificación y fermentación, puede darse una producción de etanol que oscila en los 270 litros por tonelada de bagazo en base seca (Melo *et al.*, 2008).

Considerando el incremento en la generación de residuos asociados a la producción de aceite de ricino para la producción de biodiesel, la utilización del bagazo en relación con la generación de etanol, puede asociarse en el proceso de transesterificación, reduciendo costos y dando una solución para la utilización del bagazo residual de semilla de higuierilla (Melo *et al.*, 2008).

A nivel mundial, el cultivo de higuierilla no se ha desarrollado a gran escala, siendo un cultivo considerado de gran importancia industrial, hace que el estudio de las características taxonómicas y productivas sea el primer paso en

la selección y posterior mejoramiento de las diferentes variedades con miras en la producción sustentable de biocombustibles a gran escala (Leal y Jiménez, 2009).

La producción de biodiesel debe ser un proceso sustentable, tanto económicamente como ecológica y socialmente debido a la necesidad de un cambio en las tendencias de consumo de energéticos derivados del petróleo; en México, esta importancia se hace aun mayor considerando que México es uno de los principales países emisores de CO<sub>2</sub> a nivel mundial (15° lugar) y el tercero a nivel continental, lo cual justifica la realización de la presente investigación.

### **1.1 Objetivos**

- 1) Caracterizar fenotípica y molecularmente colectas de higuera (*Ricinus communis* L.) originarias de los estados de Nuevo León, San Luis Potosí, Chihuahua y Estado de México.
- 2) Evaluar la producción de semilla, aceite y biodiesel de las diferentes variedades de higuera.
- 3) Evaluar la calidad del biodiesel producido a través de las propiedades reológicas del biodiesel.

### **1.2 Hipótesis**

En la República Mexicana existen variedades de higuera capaces de producir semilla en cantidad y calidad para hacer de la producción de biodiesel un modelo sustentable para el ambiente.

## **2. REVISION DE LITERATURA.**

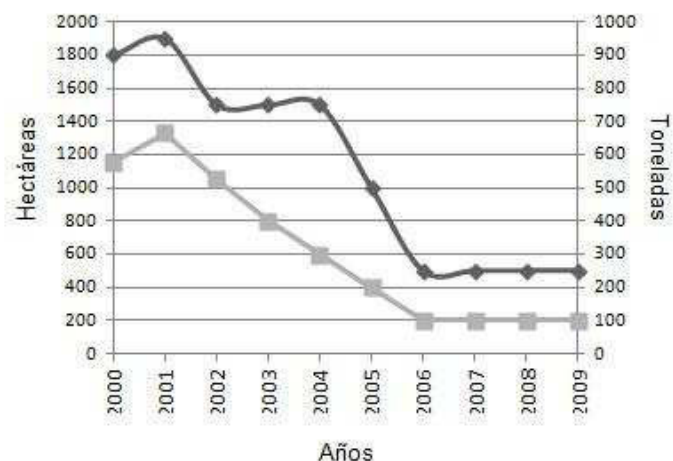
### **2.1 Situación actual de la higuera en México y el mundo.**

#### **2.1.1 Situación en México.**

En México, la producción de higuera se encuentra enfocada principalmente a la herbolaria, siendo muy poca la producción de semilla y por lo tanto de aceite de ricino. Además, la planta de higuera es considerada como una maleza por lo cual su explotación no es muy difundida en el país.

En la actualidad no existen datos precisos de la superficie sembrada de higuera ni de niveles de producción de semilla o rendimiento de aceite, principalmente debido a que en nuestro país no es considerado un cultivo sino más bien una maleza.

Según la FAO (FAOSTAT, 2010) la producción en México ha decrecido en los últimos años, como se observa en la Figura 1.



**Figura 1. Área cultivada (Línea Negra) y producción de semilla (Línea Gris) de Higuierilla en México.**

A partir del año 2001, alrededor del mundo se dio una disminución en la producción de higuierilla, causado por la disminución en el consumo del aceite de ricino por Estados Unidos, la cual afectó la producción en México; esto en parte debido al riesgo biológico por la toxicidad del mismo, siendo una de las medidas antiterroristas tomadas a partir de los atentados del 11 de Septiembre (Martínez, 2009).

### **2.1.2 Situación de la higuierilla a nivel Mundial.**

Entre los principales productores de higuierilla a nivel mundial se encuentran en primer lugar India, país en el cual se produjeron alrededor de 1;171,000 toneladas en el año 2008, seguido por China, Brasil, Mozambique y Paraguay como se muestra en el Cuadro 1 (FAOSTAT, 2010).

**Cuadro 1. Principales productores de higuera a nivel mundial.**

<b>País</b>	<b>Producción (Ton)</b>
India	1,171,000
China	190,000
Brasil	122,140
Mozambique	52,071
Paraguay	13,000

Generalmente la producción de higuera está enfocada en la producción de aceite para la industria química y de cosméticos, además de mostrar un enorme potencial para la producción de bioenergéticos (tanto biodiesel como etanol).

Históricamente, India ha sido el mayor productor de aceite de ricino, abasteciendo el mercado mundial. La producción en el mundo, al igual que en México, disminuyó debido a las restricciones de Estados Unidos para su uso (Martínez, 2009).

## **2.2 Clasificación taxonómica de la higuera.**

Diversos autores coinciden que la higuera es originaria del este de África, específicamente de la región de la antigua Abisinia, actual Etiopía y es cultivada en los climas tropicales y subtropicales alrededor del mundo (Shaheen, 2002; Samayoa, 2007; Mazzani, 2007).

La clasificación taxonómica de la higuera según Cronquist (1981) es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Euphorbiales

Familia: Euphorbiaceae

Género: Ricinus L.

Especie: Ricinus communis L.

Mientras que The Angiosperm Phylogeny Group (1998), APG, por sus siglas en inglés, la clasifica de la forma siguiente:

Angiosperms

Eudicots

Core Eudicots

Rosids

Eurosids I

Orden: Malpighiales

Familia: Euphorbiaceae

Género: Ricinus L.

Especies: Ricinus communis L.

## **2.3 Características del cultivo de la higuera.**

### **2.3.1 Generalidades del cultivo.**

La higuera es una planta que puede encontrarse de manera silvestre desde el nivel del mar hasta los 2600 msnm; entre sus características principales, y una por la cual ha sido considerada como una planta de alto potencial para la producción de bioenergéticos, es que el aceite, el cual es su principal producto, no es de consumo humano, además, de tener más de 600 aplicaciones para la industria entre las que se encuentra la producción de biodiesel (Franco, 2008).

La planta requiere de luz directa, por lo cual no puede sombrearse, pero puede intercalarse con algunos cultivos de porte bajo, medio y de ciclo corto como frijol y maíz (Franco, 2008; Samayoa, 2007).

### **2.3.2 Densidad de población.**

Se utilizan densidades de población entre las 2000 y 3000 plantas por hectárea. En caso de utilizar semilla criolla se necesitan alrededor de 5 kg de semilla por hectárea, mientras que en el caso de variedades de porte bajo o híbridos se requieren de 20 a 25 kg de semilla por hectárea (Franco, 2008).

Restrepo *et al.* (2010) reportaron densidades de siembra bajo el esquema de 3m x 1m y 3m x 0.8m en bloques comerciales obteniendo valores de beneficio-costos cercanos a 1.5. Al respecto, Camacho *et al.* (2007) reportaron densidades de siembra de 13,333 plantas ha<sup>-1</sup> sembradas con un distanciamiento entre surcos de 1.5 m y 0.5 m entre plantas para cultivares de porte bajo; en tanto que para cultivares de porte alto se reportan densidades de 3,333 plantas ha<sup>-1</sup> sembrando en esquemas de 3m x 1.5m. Además, Leal y Jiménez (2009) reportaron la siembra de la higuera a distanciamientos de 1m x 1m considerando que el cultivo no se encuentra asociado a otro.

Se pueden emplear diversos tipos de siembra entre las más utilizadas se encuentra el sembrar a 3 m entre surcos y 1.5 m entre plantas, colocando de 2 a 5 semillas por punto de siembra; una vez emergidas las plantas, se recomienda hacer un raleo, quitando las plantas hacia los lados, para evitar el daño al sistema radicular de la planta destinada a la producción (Samayoa, 2007).

Debido a que la higuera es un cultivo perenne, la primera cosecha del cultivo se realiza según la región climática donde se desarrolle. En climas cálidos la cosecha se da al cuarto mes después de la siembra, en climas templados alrededor del quinto mes y en regiones frías al sexto mes (Franco, 2008).



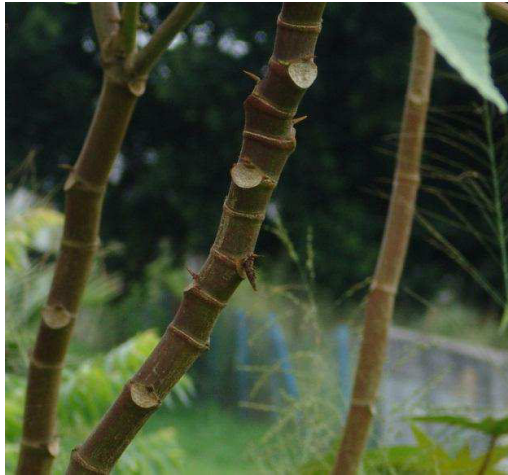
### **2.3.3 Características morfológicas de la higuera.**

#### **2.3.3.1 Características generales.**

Se trata de una planta heliófila, herbácea, glabra, anual o perenne dependiendo de las condiciones ambientales, erecta con una altura que oscila entre 1 a 7 m de altura (Mazzani, 2007).

#### **2.3.3.2 Tallo.**

El tallo de la higuera es cilíndrico, hueco con nudos y entrenudos, durante las primeras etapas de desarrollo, cuando este es mayor, los entrenudos son largos y a medida que la planta madura, el largo de los entrenudos se reduce (Figura 2). En el área de los nudos existe acumulación de puntos de crecimiento de las hojas y ramas (Samayoa, 2007).



*Figura 2. Tallo de una planta de higuera joven. Fotografía tomada en el estado de Nuevo León.*

### **2.3.3.3 Hojas.**

Las hojas son alternas, grandes, pecioladas, en forma de palma, con cierto brillo en el haz, mate en el envés (Figura 3), provista de espículas caducas, lóbulos lanceolados y márgenes dentados (Leal y Jiménez, 2009).

En cuanto a su forma, existe una gran variedad, pueden ser hojas que forman muy pocos o muchos lóbulos cuyo tamaño también tiene una gran variabilidad (Samayoa, 2007).



***Figura 3. Hoja de una planta de higuera. Fotografía tomada en el estado de Nuevo León.***

### **2.3.3.4 Ramas.**

Las ramas de la higuera se pueden clasificar en ramas principales y secundarias; se ha encontrado una relación directa entre el número de ramas y el número de racimos (Figura 4). La rama principal termina donde aparece el primer racimo; después, surgen ramas secundarias que finalizan donde aparece el segundo racimo y así sucesivamente, hasta el apareamiento de la cuarta rama y su respectivo racimo (Samayoa, 2007).



***Figura 4. Crecimiento de ramas en una planta de higuera, puede observarse el tallo principal, y las ramas secundarias. Fotografía tomada en el estado de San Luis Potosí.***

#### **2.3.3.5 Fruto.**

El fruto es una baya trilocular que contiene tres semillas en su interior, las cuales se encuentran dentro de una capsula individual (Figura 5). La cubierta del fruto puede ser lisa o recubierta de vellosidades (Mazzani, 2007; Samayoa, 2007).

Los frutos pueden ser dehiscentes (presentan apertura espontánea de la capsula para la expulsión de la semilla una vez que esta haya madurado) semi-indehiscentes o totalmente indehiscentes en los cuales la capsula no abre de manera espontánea (Samayoa, 2007).



***Figura 5. Semilla y fruto de una planta de higuera originaria del estado de Nuevo León.***

### **2.3.3.6 Raíz.**

El sistema radical de la higuera es denso y voluminoso, además puede llegar a más de un metro de profundidad, lo cual le proporciona una gran resistencia a la sequía y un buen anclaje al suelo (Samayoa, 2007; Mazzani, 2007).

### **2.3.3.7 Inflorescencia.**

Las flores de la higuera se encuentran agrupadas en inflorescencias tipo panícula terminal (Figura 6), las flores masculinas se encuentran localizadas en la base del raquis, mientras que las flores femeninas se encuentran en la parte superior (Leal y Jiménez, 2009; Mazzani, 2007, Samayoa, 2007).



*Figura 6. Inflorescencia de una planta de higuera originaria del estado de Nuevo León.*

### **2.3.3.8 Reproducción.**

La polinización, usualmente anemófila (la polinización es realizada por el viento), es la de una planta alógama (este tipo de reproducción generalmente es mayor al 30%) aunque puede también presentar autofecundación (Mazzani, 2007; Samayoa, 2007).

Las flores masculinas presentan grandes cantidades de anteras, las cuales contienen el polen que es de color amarillo (Samayoa, 2007).

#### **2.3.3.9 Semilla.**

La semilla de la higuierilla varía tanto en su color (tonalidades de café hasta blancas, con bandas negruzcas) como tamaño (la semilla puede llegar a medir hasta 18 mm de longitud y 10 mm de ancho). Cabe mencionar que el tamaño no tiene ninguna relación con la producción y el contenido de aceite (Samayoa, 2007).

### **2.4 Caracterización genética molecular.**

#### **2.4.1 Generalidades.**

Una de las maneras de determinar la diversidad en los bancos de germoplasma es la aplicación de métodos basados en la genética que a su vez envuelven métodos basados en marcadores proteicos como isoenzimas o marcadores del ADN tales como las derivadas de las técnicas de RAPDs, AFLPs, ISSRs y SSRs (Allan *et al.*, 2008).

En los últimos años, el objetivo de cualquier estudio de diversidad genética es utilizar el método de marcadores moleculares que provea la máxima cantidad de información con la menor inversión de tiempo y dinero (Allan *et al.*, 2008).

#### **2.4.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se trata de un proceso *in vitro*, a través del cual las cadenas individuales de ADN blanco son duplicadas por una enzima, la ADN polimerasa. Este proceso consta de

varios ciclos, donde, al final de cada uno de estos, las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o del segmento de ADN sometido a este proceso (Barrera *et al.*, 1992).

Existen tres pasos fundamentales dentro de cada ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa: Desnaturalización, apareamiento y extensión.

#### **2.4.2.1 Desnaturalización.**

Para que se lleve a cabo la reacción, es necesaria una desnaturalización previa del ADN que va a ser utilizado como molde, lo que significa una separación de la doble hélice de la molécula de ADN, esta separación puede lograrse con temperaturas de 92 a 98°C durante un tiempo aproximado de 30 a 90 segundos (Barrera *et al.*, 1992, Silva *et al.*, 1999).

#### **2.4.2.2 Apareamiento o alineamiento.**

La enzima utilizada en la técnica de PCR (ADN polimerasa), requiere de una cadena preexistente de ADN molde y un segmento sintético que complemente dicha cadena, este segmento conocido como primer o iniciador, es un oligonucleótido de 15 a 30 bases nucleotídicas. Para que el apareamiento pueda llevarse a cabo se requieren temperaturas que oscilen entre los 50°C y 60°C durante un tiempo de 30 a 60 segundos (Barrera *et al.*, 1992, Silva *et al.*, 1999).

#### **2.4.2.3 Extensión.**

Este último paso dentro de la técnica de PCR es la extensión del primer o iniciador a través de la ADN polimerasa y desoxiribonucleósidos trifosfatados (dNTPS). Esta extensión da como resultado la síntesis de una copia del ADN;

se requieren para este paso, temperaturas entre los 70°C y 74°C durante un tiempo de 30 a 60 segundos (Barrera *et al.*, 1992, Silva *et al.*, 1999).

### **2.4.3 ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD).**

Una gran limitante que existe en la utilización de métodos basados en PCR para el análisis genético de diversos organismos de interés es el conocimiento *a priori* de las secuencias de nucleótidos del genoma de los organismos con el fin de diseñar y sintetizar primer's o iniciadores. Para resolver esta limitación se utiliza la técnica de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente o RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) debido a que es una técnica sensible y rápida para la identificación de un gran número de representativos del ADN blanco y que no se encuentran en secuencias particulares o tipos de secuencias (Walker y Rapley, 2008).

Esta técnica ha sido desarrollada para el mapeo genético, además de ser usada en el análisis de polimorfismo en poblaciones de diferentes organismos. Además, esta técnica ha probado ser una herramienta muy útil para la diferenciación de especies o subespecies entre cepas, poblaciones de una variedad de microorganismos, plantas, mamíferos y por lo tanto, prácticamente para todo tipo de organismo (Walker y Rapley, 2008).

En comparación con otros métodos de polimorfismo, RAPD ofrece grandes ventajas como lo son: la amplificación de fragmentos anónimos del ADN blanco, no se requieren grandes cantidades de ADN blanco, acepta una cantidad ilimitada de iniciadores, además de que no requiere el conocimiento previo de las secuencias que van a ser amplificadas (Walker y Rapley, 2008).

#### **2.4.4 Estimación de la distancia genética.**

Los índices de distancia genética se calculan entre pares de poblaciones y pretende describir el grado de diferencia genética entre ambas, siendo la medida de distancia genética de Nei (1977) la más utilizada. Este índice pretende estimar el número de mutaciones que a nivel nucleotídico se han acumulado en las secuencias de dos linajes a partir del tiempo transcurrido desde su divergencia original (Piñero *et al.*, 2008).

Nei (1987) plantea la idea de que los diferentes alelos (a la presencia o ausencia de los loci para el caso de los marcadores basados en PCR, como RAPD, AFLP u OSSR) es originada gracias a que un codón (o una base nucleotídica en el caso de los marcadores relacionados con el PCR) es distinto. Por lo tanto a partir de datos de frecuencias alélicas debería ser posible calcular estadísticamente el número promedio de las diferencias en los codones o en las bases nucleotídicas por locus. Dado que este número es una medida directa de las diferencias genéticas entre dos poblaciones, se le considera como una medida de distancia genética.

#### **2.5 Métodos de clasificación: Análisis de Conglomerados.**

El análisis de conglomerados (AC) es la clasificación de “*n*” objetos similares en diferentes categorías, siendo utilizados tanto para el análisis morfológico, como molecular de una especie de interés; este análisis hace uso de diferentes métodos para la formación de agrupamientos y son clasificados como métodos aglomerativos jerárquicos y métodos no jerárquicos; los métodos jerárquicos conocidos son: a) enlace simple, b) enlace completo, c) media de grupo, d) media ponderada (UPGMA), e) Centroide, f) Mediana, g) Suma de cuadrados, h) Mínima varianza o método de Ward; en general, los métodos antes descritos se realizan a partir de la estimación de una matriz de proximidades (similitud o disimilitud), estas medidas son conocidas comúnmente como medidas de asociación (Afifi y Clark, 1999).



### **2.5.1 Método de Ward**

Considerando que al unir dos grupos la varianza tiende a aumentar, el método de Ward calcula cual sería la varianza de dos grupos, en caso de unirlos, uniendo en el paso siguiente aquellos grupos cuya varianza sea mínima. En caso de tener en cuenta más de una sola variable, en lugar de la varianza, se unen grupos cuya inercia (suma de la diagonal principal de la matriz de varianzas y covarianzas) sea mínima (Álvarez 1994).

### **2.5.2 Método UPGMA**

El método UPGMA es uno de los más empleados en la actualidad; se comienza localizando en la matriz de distancias emparejadas la pareja de secuencias separadas por una menor distancia genética y se les une mediante una rama con una longitud proporcional a dicha distancia. Entonces se considera a ambas secuencias como una unidad y se recalcula su distancia al resto de secuencias como la media de ambas secuencias a cada una de las demás. Aplicando recursivamente este procedimiento se consigue unir todas las secuencias en una jerarquía de parecidos (Pallás, 2008).

## **2.6 Cultivo y producción de biodiesel a partir de higuera.**

### **2.6.1 Suelo.**

La higuera se desarrolla en una gran cantidad de tipos de suelo, siendo las únicas limitantes, aquellos suelos que acumulan el exceso de agua provocando encharcamientos; además, no tolera suelos salinos o sódicos y con pendientes mayores a 12% (Samayoa, 2007).

El desarrollo de la higuera puede verse afectado por altas concentraciones de aluminio en el suelo, lo cual implica toxicidad a la planta. El rango óptimo de pH del suelo para el buen desarrollo de la higuera es de 5.5 a 6.7. Presenta buen desarrollo en suelos con alto contenido de materia orgánica (más de 2% en climas cálidos y mayores a 5% en climas templados y fríos). Debido a que las raíces de la higuera son suculentas y poco agresivas, se le dificulta su desarrollo en suelos que presentan problemas de compactación (Martínez y Montenegro, 2008).

### **2.6.2 Necesidades hídricas.**

En condiciones de temporal, la higuera necesita al menos 700 mm de precipitación para alcanzar rendimientos aceptables; debido a que se trata de una planta xerófila, altas precipitaciones y humedades relativas altas favorecen el desarrollo de diversos problemas sanitarios (Córdoba y Ríos, 2008)

En El Salvador, se reportó que la precipitación mínima necesaria para la producción de higuera puede ser a partir de los 500 mm; bajo estas condiciones, puede ser un cultivo productivo, pero si aumenta la cantidad de agua disponible el periodo de fructificación puede prolongarse (Samayoa, 2007).

### **2.6.3 Fertilización.**

Para saber los niveles de fertilización óptimos, es necesario conocer el nivel nutricional del suelo donde se pretende establecer el cultivo de higuera; Samayoa (2007) recomendó la aplicación de 40 kg de  $P_2O_5$   $ha^{-1}$  en la siembra, 40 kg de N  $ha^{-1}$  al inicio de la floración y 40 kg de  $K_2O$   $ha^{-1}$  para una buena producción de semilla.

En tanto Camacho *et al.* (2007) reportaron la aplicación de la formula 15-50-50 (N-P-K) en la siembra y 35 kg de N a los 45 días de la germinación.

Para suelos de textura franca y moderadamente ácidos, se recomienda la aplicación de 55 kg de N ha<sup>-1</sup>, 75 kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup> y 55 kg de K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup> (Navas, 2008).

#### **2.6.4 Plagas.**

En poblaciones silvestres de higuera usualmente no se presentan plagas, en cambio, cuando la higuera es cultivada, ocasionalmente se presentan problemas con gusanos trozadores (los cuales afectan las plántulas cuando empiezan a emerger del suelo) y chinches de encaje (chupan la savia de la planta) que se localizan en el envés de la hoja causando decoloraciones en las hojas las cuales finalmente se secan (Londoño, 2008).

De manera preventiva se pueden aplicar diferentes insecticidas como Volatón, Furadán o Agromil. De entre las plagas que más afectan a la higuera se encuentran *Spodoptera sp.*, *Agrotis sp.* y *Elasmopalpus sp.* para las cuales se recomienda la aplicación de deltametrina o carbaryl y la utilización de productos biológicos a base de *Bacillus thuringiensis* (Samayoa, 2007).

#### **2.6.5 Enfermedades.**

Las principales enfermedades que amenazan el cultivo de higuera son hongos. En el cuello y raíces se presentan lesiones causadas por *Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.* y *Phytophthora sp.*; en tallos se han encontrado *Colletotrichum sp.* y *Botryodiplodia sp.*, también se han encontrado lesiones foliares provocadas por *Cercospora sp.*, *Cladosporium sp.*, y *Alternaria sp.*, mientras que *Botrytis sp.* en temporada de lluvias provoca lesiones y pudriciones en flores y frutos (Saldarriaga, 2008).

### **2.6.6 Malezas.**

Las malezas, al entrar en competencia con el cultivo, disminuyen su eficiencia para el buen aprovechamiento de los recursos disponibles, por lo cual debe hacerse un buen manejo para optimizar la producción; este manejo incluye la aplicación de diversos herbicidas o el retiro mecánico o manual de las mismas (Samayoa, 2007).

Dentro de las características fisiológicas de la semilla de higuera es que presenta un cierto grado de dormancia, tardando hasta 20 días para su emergencia en climas fríos, por lo cual se vuelve indispensable el manejo de las malezas. Se recomienda que desde los 15 días hasta el tercer mes después de la siembra, se realice el manejo cultural adecuado, después del tercer mes el desarrollo de la planta así como su arquitectura favorecen su desarrollo y competencia (Córdoba, 2008).

## **2.7 Higuera y sus toxinas.**

### **2.7.1 Principales toxinas presentes en la planta.**

Mazzani (2007) mencionó que las principales toxinas presentes en la planta de higuera son:

- ✓ Ricina
- ✓ Acido Ricinoleico
- ✓ Ricinina
- ✓ Complejo Alergenico CB-1<sup>a</sup>

### **2.7.2 Ricina.**

La ricina es una proteína potencialmente tóxica que se encuentra en las semillas de la higuera. Aunado a esto, es considerada una proteína con un alto potencial anti-cáncer, particularmente cuando se utiliza como componente de inmunotoxinas. Existen una gran cantidad de isoformas de la ricina incluyendo ricina D, ricina E y aquellas que se encuentran relacionadas de manera cercana a la lectina, *Ricinus communis* aglutinina (RCA), que en su conjunto constituyen más del 5% del total de proteína que se encuentra en las semillas de la higuera. Se trata de una proteína que actúa como inhibidora del ribosoma, clasificada como RIP tipo II debido a que contiene dos cadenas polipeptídicas; la primera tiene propiedades de inhibir la síntesis de proteínas y la segunda actúa como lectina, es decir, es capaz de formar uniones con hidratos de carbono; la ricina entra por endocitosis a la célula a través de la unión de la subunidad B (RTB) con componentes de la superficie que contienen residuos de galactosa (Lord *et al.*, 1994; Pita *et al.*, 2004).

### **2.7.3 Toxicidad.**

La ricina es probablemente la proteína más tóxica conocida por el hombre, se trata de una sustancia tóxica tanto para humanos como para animales e insectos. Esta proteína es soluble en agua, razón por la cual el aceite de ricino no es tóxico. El ácido ricinoleico en cambio, no es tan tóxico en comparación a la ricina; este provoca una alteración en la mucosa intestinal y por consecuencia provoca deshidratación, debido a estas características es considerado como un remedio laxante (Mazzani, 2007).

## **2.8 Producción de aceite de ricino.**

La producción de aceite de ricino engloba distintas prácticas que van desde la recolección o cosecha de la semilla, el secado, descascarado, calentamiento de

semillas, prensado, extracción por solventes, filtración y almacenamiento (Valderrama *et al.*, 1994).

### **2.8.1 Cosecha de semilla.**

En las variedades dehiscentes, la cosecha debe realizarse cuando estos alcancen un mínimo del 30% de capsulas secas en el racimo, mientras que en variedades semi-indehiscentes, debe esperarse a que haya un 70% de capsulas secas en el racimo; finalmente; en variedades indehiscentes, todas las capsulas deben estar completamente secas (Franco y Córdoba, 2008).

### **2.8.2 Preparación de la semilla: secado y descascarado.**

En esquemas industriales, la semilla, después de cosecharse, debe ponerse directamente a los rayos del sol y moverse varias veces para descascararla, evitando la exposición a la humedad debido a que esto aumenta la acidez del aceite, reduciendo su calidad. Además, debe evitarse el almacenamiento de los frutos y la semilla con una humedad superior al 10% (Franco y Córdoba, 2008).

### **2.8.3 Calentamiento de las semillas.**

Antes de iniciar la extracción de aceite, es importante el calentamiento de las semillas de higuera, este calentamiento debe de ser de manera indirecta alcanzando una temperatura de hasta 52°C con el fin de obtener un mejor rendimiento en la extracción del aceite; se debe tener cuidado de no superar esta temperatura debido a que pueden presentarse alteraciones en la calidad del aceite (Valderrama *et al.*, 1994).

#### **2.8.4 Prensado de las semillas.**

Para llevar a cabo el proceso de prensado, las semillas se colocan en bolsas de tela filtrante, esto con el fin de reducir al mínimo la cantidad de impurezas. El prensado debe hacerse de manera rápida para evitar que las semillas se enfríen y pierdan las características deseadas en la calidad del aceite; durante el prensado no se debe disminuir la presión para evitar que la torta reabsorba el aceite; el tiempo de prensado está en función de la presión ejercida y la velocidad de escurrimiento del aceite; por su alta viscosidad, el aceite de ricino tiene una lenta velocidad de escurrimiento. Una vez prensada la semilla, el aceite obtenido se filtra y la torta residual es acondicionada para un segundo prensado o para extracción por disolvente (Valderrama *et al.*, 1994).

#### **2.8.5 Extracción por solvente.**

Una vez prensada, la torta aun contiene considerable cantidad de aceite, por lo cual debe efectuarse una segunda extracción. Esta extracción se realiza a temperatura constante de 40°C, la torta se rocía con solvente por un tiempo de alrededor de 6 horas y clasificando el aceite obtenido por este método como de segunda clase (Valderrama *et al.*, 1994).

#### **2.8.6 Filtración.**

Durante la etapa de prensado, el aceite resultante generalmente contiene un alto grado de impurezas, por lo cual debe de filtrarse. Este proceso es lento debido a la alta viscosidad del aceite de ricino; para acelerar la filtración de aceite puede calentarse hasta 105°C, procurando no calentar durante mucho tiempo para evitar problemas de calidad en el aceite (Valderrama *et al.*, 1994).

### 2.8.7 Almacenamiento de aceite.

Este debe hacerse en un lugar fresco, con baja humedad relativa; dependiendo la cantidad, se pueden usar tambos o garrafas procurando que el lugar donde se almacene sea obscuro (Valderrama *et al.*, 1994).

### 2.8.8 Características deseables.

Entre las principales características del aceite de higuera es la gran viscosidad que presenta, la cual le confiere características deseables en la industria de la aeronáutica y de maquinaria pesada (Mazzani, 2007).

El aceite de ricino para la industria debe ser resistente a bajas temperaturas, quemarse sin dejar residuos y presentar una alta miscibilidad en alcohol y en ácido acético glacial; además, debe presentar las características que se presentan en el Cuadro 2.

**Cuadro 2. Características deseables del aceite de ricino**

<b>Características</b>	<b>Valores</b>
Punto de Fluidez	16° C
Punto de Congelación	-30 a -40°C
Densidad (a 20°C)	0.955 a 0.968 gr/ml
Viscosidad (a 20°C)	9.5 a 11 poises
Índice de refracción	1.473 a 1.476
Índice de saponificación	175 a 187
Materia Insaponificable	0.3 a 0.7%
Índice de Hidroxilo	Mínimo 160

Fuente: Valderrama *et al.*, 1994



## **2.9 Producción de biodiesel a partir de aceite de ricino.**

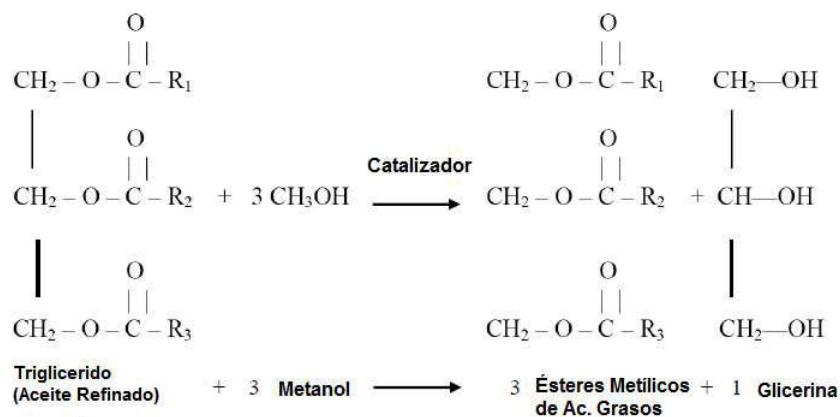
En la actualidad, el biodiesel producido a base de aceite de ricino parece ser una tecnología muy conveniente, en primer lugar el aceite de higuera no es comestible, la planta de la higuera puede cultivarse en tierras marginales y no necesita procesos extras a la transesterificación para ser utilizado.

### **2.9.1 Transesterificación.**

La transesterificación es el proceso químico mediante el cual se transforman los aceites de origen vegetal en ésteres ácidos y glicerina. Una ventaja del biodiesel es que gracias a la transesterificación, se reduce la viscosidad del aceite, dándole características muy similares al diesel de origen fósil, lo que permite reducir los problemas que se presentan con la utilización de aceites como aditivos en motores a diesel (Rutz y Jansen, 2007).

El proceso de transesterificación agrupa tres tipos de reacciones, si un éster reacciona con un alcohol, la reacción que se llevara a cabo será una alcoholisis, si la reacción del éster es con un ácido carboxílico, la reacción será acidólisis y si la reacción es entre dos ésteres, se llevara a cabo una reacción de interesterificación (Aliseda, 2003).

En aceites vegetales, la transesterificación es aquella en la cual, una molécula de triglicérido reacciona con una molécula de alcohol bajo la acción de un catalizador para producir una mezcla de ésteres de ácidos grasos y glicerina. En la Figura 7 se muestra la reacción de manera simplificada (Rutz y Jansen, 2007).



**Figura 7. Proceso de transesterificación. Adaptado de Rutz y Jansen, 2007**

Benavides *et al.* (2007) reportaron la producción de biodiesel de higuerilla utilizando una relación de metanol/aceite de 9 y una concentración de hidróxido de sodio como catalizador de 0.8%, obteniendo un biodiesel que al 15% combinado con diesel de origen fósil sigue manteniendo la calidad estipulada en los estándares internacionales.

Además, Lozada y Velásquez (2009) reportaron que la mejor concentración de hidróxido de sodio como catalizador es del 0.23% w/w, una temperatura de reacción de 55°C y una relación volumétrica alcohol/aceite de 1.35; bajo estas condiciones puede obtenerse una conversión del 98-99% en 120 minutos, siendo este el punto óptimo de la reacción.

## 2.10 Subproductos en la elaboración de biodiesel.

Durante la producción de biodiesel se obtienen dos subproductos de importancia, durante el prensado el producto residual es la torta, mientras que en el proceso de transesterificación se produce glicerina, la cual puede ser utilizada en la industria.

### **2.10.1 Torta.**

La torta que da como resultado el prensado de las semillas de higuera para la obtención de aceite de ricino, contiene 5.5% de grasa, 20.4% de proteína, 24% de carbohidratos y 10.5% de minerales. Para su uso como alimento para ganado, debe sufrir un proceso de desintoxicación, además puede utilizarse también como abono, el cual tiene características nematocidas e insecticidas (Mazzani, 2007).

### **2.10.2 Glicerina.**

Después de la reacción de transesterificación, la glicerina debe removerse de los metilésteres, esta separación puede llevarse a cabo de manera sencilla debido a que la glicerina posee un nivel bajo de solubilidad, pudiendo ser separada por decantación o centrifugación. Posterior a la separación, la glicerina se encuentra en concentraciones que pueden alcanzar hasta el 70%, siendo el resto metanol no reaccionado, la mayor parte del catalizador, los jabones formados por la reacción de los ácidos grasos libres y el hidróxido de sodio. Debido a esto debe ser purificada antes de utilizarse para:

- 1) Combustible.
- 2) Fertilizante para suelos.
- 3) Suplemento en la producción de alimentos balanceados.
- 4) Producción de Propilenglicol (PG)

Además, la glicerina puede utilizarse también para la producción de bioetanol, empleando microorganismos como *Escherichia coli* para catalizar la producción de etanol por fermentación de glicerina (Aimaretti, 2008).

## 2.11 Caracterización molecular de biocombustibles.

La calidad del biodiesel determina el funcionamiento y la vida útil de los equipos de inyección de combustible en los motores diesel. De igual manera determina el éxito en el mercado y la satisfacción o el rechazo de sus consumidores, principalmente a largo plazo. La composición química del biodiesel y del diesel fósil es diferente, dando origen a propiedades similares o diferentes según el caso. El diesel no contiene oxígeno y contiene 25-35% de hidrocarburos aromáticos, 65-75% de parafinas y trazas de olefinas, teniendo componentes principalmente en el rango de C10 a C16. El biodiesel contiene ácidos grasos de alquilésteres principalmente en el rango de C16 a C18, con un contenido de oxígeno del 11% p/p (Mittelbach y Remschmit, 2004).

Las normas estandarizadas son documentos aprobados y reconocidos por un grupo de expertos de cada país para asegurar la alta calidad del biodiesel, y se basan en una serie de parámetros físicos y químicos establecidos para medir sus propiedades. El cumplimiento de éstos es necesario para que el biodiesel pueda ser comercializado. Existe una gran variedad de materias primas utilizadas en la producción de biodiesel, y el uso de unas u otras implica importantes diferencias en las propiedades del biodiesel obtenido. A nivel regional esta amplia gama de materias primas se reduce a aquellas que se encuentran con una mayor disponibilidad. De este modo, en los países europeos, el biodiesel se produce principalmente a partir de aceites usados de cocina y grasas animales y en menor proporción aceite de colza, así como de aceites importados (soya y palma), mientras que en los americanos se realiza con aceite de soya, excepto en las zonas tropicales y subtropicales de Centroamérica, donde se produce con aceite de palma al igual que en Indonesia y Malasia. Por esta razón, cada país implementa sus propias normas debido a que copiar estándares extranjeros puede constituir una barrera, ya que en muchos casos, estos estándares son diseñados con el objetivo de controlar el mercado en lugar de facilitar su implementación (Castro *et al.*, 2007).

Las principales normas técnicas para biodiesel son la europea EN 14214 (European Committee for Standardization, CEN) y la estadounidense ASTM D6751 (American Standard Test Methods). Además, hace poco fue implementada la norma ASTM D7467 para regular la mezcla de biodiesel con diesel de 6 a 20% v/v (B6 a B20).

### **2.11.1 Propiedades del biodiesel y métodos evaluativos.**

Las propiedades del biodiesel dependen tanto del proceso de fabricación como de la naturaleza de los lípidos a partir de los cuales se ha producido.

Los aspectos más importantes que se deben procurar en la producción de biodiesel para asegurar una operación libre de problemas en los motores diesel son:

- ✓ Reacción completa (evitar la presencia de mono, di y triglicéridos).
- ✓ Eliminación de la glicerina.
- ✓ Eliminación del catalizador y otras sustancias.
- ✓ Eliminación de alcohol.
- ✓ Ausencia de ácidos grasos libres.
- ✓ Ausencia de agua en el producto final.

Si alguno de estos aspectos no se logra adecuadamente haciendo que cumplan las especificaciones, se presentan diferentes tipos de problemas en el motor tales como formación de depósitos en las boquillas de inyección, corrosión, etc. Otros aspectos, tales como la eliminación del metanol, son de importancia desde el punto de vista de la manipulación segura del combustible. Por otro lado el biodiesel en función de la naturaleza de la fuente, animal o vegetal, proporcionará unas características particulares al nuevo combustible.

Por estas razones se debe realizar una serie de ensayos para comprobar la calidad del combustible, que dependerá del nivel de impurezas remanentes en

el producto final. Las especificaciones propuestas por la normativa EN 14214 son las que se describen a continuación.

### **2.11.2 Contenido de metilésteres (EN 14103).**

El contenido de metilésteres (% FAME) se mide usando cromatografía de gases (CG) con una columna de composición polar como fase estacionaria. Los metilésteres se sepaan de acuerdo a la longitud de sus cadenas (cantidad de C) y el número de dobles enlaces. La norma estandarizada EN 14103 considera los ésteres contenidos entre el miristato (C14:0) y el metil éster del ácido nervónico (C24:1). Se utiliza metilheptadecanoato (99.5% de pureza) como patrón interno. Este parámetro nos indica la pureza que tiene el biodiesel. Un biodiesel de calidad debe tener mínimo un contenido de metilésteres del 96.5% p/p cuando es puro. Un bajo contenido de metilésteres indica unas condiciones de reacción no apropiadas, o la presencia de contaminantes tales como alcohol residual, glicéridos, glicerol, metales o componentes menores como tocoferoles, fosfolípidos, esteril glucósidos (fitoesteroles), clorofilas, grasas solubles, vitaminas e hidrocarburos (alcanos, escualenos, carotenos e hidrocarburos policíclicos policarbonados) (Moser, 2009).

Con este mismo método es posible determinar la composición original del aceite después de la transesterificación (EN 5508 y EN 5509). De igual manera, también es posible determinar el contenido de ácido linolénico (C18:3). Este ácido insaturado está limitado por las especificaciones hasta un máximo de 12% p/p debido a que causa baja estabilidad oxidativa y depósitos en el motor. De igual manera, sólo admite un máximo de metilésteres poliinsaturados ( $\geq 4$  dobles enlaces) de 1.0% p/p. Las normas ASTM no tienen una especificación equivalente, siendo uno de los objetivos más importantes y de mayor dificultad a la hora de producir biodiesel. Este análisis cromatográfico es aplicado a los metilésteres, pero ellos podrían necesitar modificaciones para analizar etil,

isopropil o alquilésteres más grandes, donde se presenta un pequeño desplazamiento de picos en los cromatogramas (Knothe *et al.*, 2005).

### **2.11.3 Contenido de mono-, di- y triglicéridos (EN 14105).**

La norma EN 14105 se utiliza para determinar simultáneamente el contenido de glicerol, mono-, di y triglicéridos por cromatografía de gases (CG), con una columna resistente de alta temperatura de composición no-polar como fase estacionaria. El cromatógrafo debe tener un inyector “on-column” para la correcta introducción de los triglicéridos en la columna cromatográfica, manteniendo así la representatividad de la muestra. Se necesitan dos patrones internos para calibrar la columna y los análisis: el primer patrón (P1) es el 1,2,4-butanotriol (P1) para determinar y calibrar el contenido de glicerol, y el segundo patrón (P2) es 1,2,3-tricaproilglicerol (tricaprina) que se usa para detectar y analizar el contenido de mono-, di y triglicéridos. Previamente al análisis, las muestras son derivatizadas con N-metil-N-trimetilsilil-trifluoracetamida (MSTFA) para mejorar las propiedades cromatográficas de los glicéridos analizados. Sustancias de referencia tales como glicerol, monooleína, monopalmitina, monoestearina, dioleína y trioleína se utilizan para obtener curvas de calibración apropiadas. La presencia de estos glicéridos indica una reacción incompleta, por eso dependen de los procesos de producción. Pueden reducirse optimizando las condiciones de la reacción o destilando el producto final (Mittelbach y Remschmit, 2004).

Un valor alto de mono y diglicéridos puede causar depósitos en los inyectores y en los cilindros, debido a que poseen altos puntos de fusión y cristalización a bajas temperaturas. Por otro lado, valores altos de triglicéridos indican que hay aceite o grasa sin reaccionar, lo que produce un incremento en la viscosidad (Agarwal, 2007).

Los valores máximos permitidos son: 0.8% p/p para monoglicéridos y 0.2% p/p para diglicéridos y triglicéridos. Las normas ASTM no tienen una especificación equivalente y por lo tanto no los evalúan.

#### **2.11.4 Contenido de agua (EN ISO 12937).**

La medida del contenido de agua se realiza mediante el método Karl Fisher por medio de valoraciones coulombimétricas. La muestra previamente pesada, se introduce en el recipiente de valoración de un equipo Karl Fisher que induce la generación de yoduro en el ánodo por oxidación electroquímica. Cuando se ha valorado toda el agua el exceso de yoduro, se detecta mediante un electrodo de punto final electrométrico (la ausencia de yodo). De la cantidad de yoduro generado se calcula la cantidad de electricidad requerida de acuerdo con la Ley de Faraday. El contenido de agua es proporcional al yoduro generado.

El biodiesel puede contener pequeñas cantidades de agua disueltas o como gotas suspendidas. El agua se puede formar por condensación en el tanque de almacenamiento, ya que depende de cómo se manipule y transporte el combustible. El biodiesel es muy higroscópico y puede absorber más agua que el diesel. El agua puede provocar dos problemas en el motor:

- ✓ Corrosión en los componentes del motor, generalmente herrumbre. El agua se acidifica y acaba atacando a los tanques de almacenamiento.
- ✓ Contribución al crecimiento de microorganismos. Forman lodos y limos que pueden colmatar los filtros. Además, algunos de estos microorganismos pueden convertir el azufre que posea el combustible en ácido sulfúrico, que corroe la superficie metálica del tanque.

Para el contenido de agua, la norma europea EN 14214 establece un valor máximo de 500 mg/kg. La norma americana equivalente es la ASTM D2709, mientras que la norma del diesel (EN 590) establece un valor máximo de 200 mg/kg.



### **2.11.5 Estabilidad a la oxidación (EN 14112).**

Sirve para determinar la vida de almacenamiento y la degradación potencial de un combustible durante su almacenamiento. Para determinar la estabilidad a la oxidación en el biodiesel se utiliza un equipo de oxidación acelerada llamado Rancimat. La muestra a analizar se coloca en un recipiente a través de la cual se hace pasar una corriente de aire purificado y se calienta a la temperatura determinada (110°C). Durante la oxidación se liberan vapores que son recogidos por el aire en un matraz con agua destilada en el cual un electrodo mide la conductividad y su variación con el tiempo. Cuando la conductividad aumenta rápidamente finaliza el periodo de inducción y el tiempo transcurrido hasta un máximo (en horas), este valor representa la estabilidad a la oxidación. El contacto con el aire es la mayor causa de oxidación, produciendo un aumento en el índice de acidez y la viscosidad del biodiesel. Esto también produce un oscurecimiento en el color y causa mal olor. En los aceites originales existen antioxidantes naturales, pero algunos de ellos se extraen durante el refinado, por eso se permite el uso de aditivos para mejorar este parámetro (Mittelbach y Schober, 2003).

El número de dobles enlaces (presentes en esteres mono, di y poliinsaturados) en el biodiesel perjudica la estabilidad a la oxidación (Canakci y Sanli, 2008).

La oxidación de un combustible suele venir acompañada de la formación de gomas solubles e insolubles que pueden colmatar los filtros y formar depósitos en las boquillas de los inyectores. Además, dicha estabilidad a la oxidación se puede ver alterada por los diversos contaminantes que están presentes en el biodiesel. Un tiempo inferior de estabilidad a la oxidación no aseguraría la estabilidad del biodiesel durante su almacenaje y distribución (Agarwal, 2007).

### **2.11.6 Índice de Yodo (UNE 14110).**

El Índice de Yodo mide el total de insaturaciones de un aceite o su correspondiente biodiesel como la cantidad de  $I_2$  necesario para saturar a 100g de muestra; se expresa como g  $I_2/100g$ . Para determinar el Índice de Yodo, se pesa una muestra y se diluye en un solvente (una mezcla de ácido acético y ciclohexano) y se hace reaccionar con reactivo de Wijs (contiene monocloruro de yodo) durante una hora en la oscuridad. Posteriormente las muestras se titulan con tiosulfato de sodio, luego se les adiciona agua y una cantidad de solución de KI usando almidón como indicador. La titulación se compara con un blanco. Existe otro método mucho más utilizado y más preciso que consiste en calcular el Índice de Yodo en función de las contribuciones de cada éster que compone el biodiesel, sirviendo la norma EN 16300. Esto requiere la obtención previa del perfil de ésteres metílicos por cromatografía de gases.

Valores altos de Índices de Yodo favorecen procesos de oxidación, polimerización y procesos de hidrólisis. Para el Índice de Yodo la norma europea EN 14214 establece un valor máximo de 120 g  $I_2/100 g$ . Las normas ASTM no tienen una norma equivalente.

### **2.11.7 Densidad (EN ISO 3675, EN ISO 12185).**

La medida de la densidad, tanto para el diesel como para el biodiesel, se realiza mediante el método del aerómetro. La muestra que se va a analizar debe estar a una temperatura especificada y se traspasa a una probeta a la misma temperatura. Se introduce el aerómetro en la muestra y se deja estabilizar. Una vez alcanzado el equilibrio térmico se lee en la escala del aerómetro. Se lee la temperatura de la muestra y se convierte la lectura del aerómetro a 15°C utilizando tablas de medición estandarizadas. Si fuese necesario se coloca la probeta en un baño a temperatura constante para evitar variaciones durante el experimento.

El biodiesel generalmente es más denso y con menor capacidad de compresión que el diesel. Esta diferencia afecta el poder calorífico y al consumo del combustible. La densidad del biodiesel depende de su composición, siendo mayor al disminuir la longitud de la cadena y aumentar el número de dobles enlaces. De otra manera depende de su pureza, ya que disminuye con contaminantes de baja densidad como el metanol o gomas (Benjumea *et al.*, 2009; Canakci y Sanli *et al.*, 2008).

La densidad es un parámetro determinante del porcentaje de biodiesel máximo en la mezcla. Por tanto se puede dar el caso de mezclas que no cumplen con la norma. Eso ocurre con mezclas que contienen un alto porcentaje de biodiesel, o aquellas en las cuales la densidad de diesel sea próxima al límite superior permitido (Pasquillano, 2006). Para la densidad, la norma europea EN 14214 establece un intervalo permitido entre 860 – 900 kg/m<sup>3</sup>. Las normas ASTM no tienen una especificación equivalente.

#### **2.11.8 Viscosidad (EN ISO 3104).**

La medida de la viscosidad se realiza utilizando un viscosímetro de Oswald, con el que se determina la viscosidad cinemática y se calcula la viscosidad dinámica. Se introduce un volumen exacto de la muestra a analizar en un viscosímetro capilar calibrado a una temperatura conocida y controlada, generalmente dentro de un baño maría. Aplicando presión o mediante aspiración, se succiona la muestra sobre la marca superior, y se deja fluir por gravedad. Con un cronómetro se mide el tiempo que tarda el menisco de la muestra en fluir desde la marca superior hasta la inferior. La viscosidad se calcula como un producto del tiempo por la constante del viscosímetro. La viscosidad dinámica se calcula multiplicando la viscosidad cinemática por el valor de la densidad de la muestra a la misma temperatura.

El combustible puro o la mezcla con biodiesel deben poseer una viscosidad mínima para evitar pérdidas de potencia debidas a las fugas en la bomba de

inyección y en el inyector. Además, esta propiedad le da características de lubricidad al sistema de combustible (Demirbas, 2007).

El biodiesel generalmente presenta viscosidades mayores a las del diesel, ya que la viscosidad del biodiesel aumenta con la longitud de la cadena del éster y el grado de saturación. Una alta viscosidad puede afectar la atomización del combustible por lo que causa una mala combustión y formación de depósitos en el motor. La alta viscosidad también puede facilitar la dilución del combustible en el lubricante (Knothe *et al.*, 2005).

Para la viscosidad (40°C) la norma europea EN 14214 establece un intervalo permitido entre 3.5 – 5.00 mm<sup>2</sup>/s. La norma americana equivalente es la ASTM D445 y acepta un intervalo entre 1.9 – 6.0 mm<sup>2</sup>/s.

#### **2.11.9 Punto de inflamación (EN ISO 3679).**

Es la temperatura más baja a la cual los vapores liberados por un líquido pueden formar una llama con el oxígeno del aire. El punto de inflamación (Flash Point) es una medida de la inflamabilidad de un combustible, por lo que es un parámetro de seguridad importante para su transporte y su almacenaje. El método de determinación del flash point para el biodiesel y para el diesel es diferente, pero sólo difieren en el equipamiento utilizado; sin embargo, el método es el mismo. En ambos casos la muestra se introduce en un recipiente agitado que se calienta a incrementos de temperatura constante. A intervalos regulares de temperatura se interrumpe la agitación y a través de un orificio se somete la muestra a una fuente de ignición, con el fin de que los vapores entren en ignición y la llama producida se propague sobre la superficie de la muestra. La temperatura más baja a la que este fenómeno ocurre se le denomina punto de inflamación. El punto de inflamación del biodiesel es siempre superior al del gasoil, siendo en ocasiones por encima de 170°C. Esto es una ventaja importante en la utilización de este biocombustible. Bajos puntos de inflamación indican la presencia de alcohol residual en el biodiesel (Canakci *et al.*, 2008).

Para el punto de inflamación la norma europea EN 14214 establece un mínimo permitido de 120°C. La norma americana equivalente es la ASTM D93 y acepta un mínimo de 93°C.

#### **2.11.10 Punto de obstrucción de filtro frío (POFF) (EN 116).**

Es la temperatura más baja a la cual 20 mL del combustible pasan a través de un filtro en 60 segundos. El POFF (Cold Filter Plugging Point, CFPP) predice la mínima temperatura a la cual el motor puede operar con ese combustible. La medida del POFF tanto para el diesel como para el biodiesel se realiza utilizando el mismo método en el cual la muestra se enfría en determinadas condiciones, se aspira con una pipeta y se hace pasar por un equipo de filtración. El método se repite disminuyendo en cada etapa 1°C y finaliza cuando se superan los 60 segundos para salir de la pipeta o cuando el combustible no gotea en su totalidad antes que la temperatura disminuya otro grado centígrado. La temperatura inicial de este último filtrado se registra como POFF.

El biodiesel se congela a temperaturas más altas que el diesel convencional. Todas las propiedades de flujo en frío del combustible (punto de taponamiento de los filtros, punto de niebla, punto de escurrimiento) son superiores a las del diesel, lo que significa que a bajas temperaturas los motores con biodiesel pueden tener dificultades para arrancar. Esto es debido a que en el biodiesel se forman cristales sólidos, básicamente de grasas saturadas, que pueden bloquear los conductos de combustible. Igualmente a temperaturas relativamente bajas, la viscosidad del combustible también se incrementa, pudiendo causar estrés en las bombas de combustible y el sistema de inyección.

Estas propiedades de flujo a bajas temperaturas dependen de la materia prima con la que se fabricó el biodiesel, siendo los aceites con ácidos grasos

saturados los que más dificultad presentan. Por tal motivo, el biodiesel hecho de aceite de girasol o de colza, poseen menores puntos de fusión, lo que no sucede con el biodiesel proveniente de grasas animales, aceites reciclados o de aceite de palma. Este es uno de los mayores problemas que se encuentra a la hora de decidir el uso de biodiesel como combustible en estaciones de invierno o en zonas de temperaturas bajas, aunque se puede corregir levemente agregando aditivos anticongelantes, como se acostumbra con el diesel en algunos casos (Agarwal, 2007).

Los valores límites del punto de obstrucción de filtro en frío vienen marcados por la norma EN 590 para el diesel y la EN 14214 para el biodiesel, diferenciando dichos límites en función de la estación del año y de la zona climática.

#### **2.11.11 Destilación (ASTM D1160).**

Esta norma establece los límites de las proporciones respectivas de las cantidades recuperadas por condensación cuando se destila el diesel o el biodiesel. La norma indica la temperatura máxima a la que se debe evaporar el combustible a unas condiciones de presión y temperaturas dadas. Un combustible tiene tres franjas de compuestos bien definidas (Mittelbach y Remschmit, 2004):

- ✓ Los que destilan a temperaturas bajas que son los que caracterizan el momento de la arrancada y calentamiento del motor.
- ✓ Los que destilan a temperaturas intermedias que son los compuestos que caracterizan la reacción del motor.
- ✓ Y los que destilan a mayor temperatura que son los más pesados que determinan la potencia que pueden generar este combustible.

La curva de destilación señala el porcentaje de combustible que se evapora a determinada temperatura (T vs % v/v). El biodiesel tiene prácticamente un punto de destilación que se ubica en el rango más alto de la curva del diesel. Este

parámetro se incorpora para controlar que el combustible no haya sido contaminado con materiales de mayor punto de evaporación (Pasquillano, 2006).

Aunque para el biodiesel la norma europea no tiene exigencia de volatilidad, sirve para verificar mediante experimentación si las mezclas con diesel cumplen la norma de este. La norma americana ASTM D6751 establece un máximo de 360°C para una temperatura de destilación del 90% v/v de combustible recuperado. Además, el método requerido (ASTM 1160) exige ensayar a presión reducida (entre 1.3 y 67 mbar) con el fin de evitar el craqueo del biodiesel a partir de los 350°C. Las normas ASTM D86 y EN 3405 que establecen el procedimiento para mezclas, proponen sin embargo destilación atmosférica.

#### **2.11.12 Lubricidad.**

La medida de la lubricidad para el diesel se realiza mediante un equipo con movimiento alternativo de alta frecuencia (HFRR). La muestra a analizar se coloca en un recipiente a la temperatura del ensayo. Una bola de acero sujeta en un péndulo vertical, aplica una carga sobre una placa fija horizontal. La bola del ensayo oscila con una frecuencia y longitud determinadas, manteniendo la superficie de contacto con la placa totalmente sumergida en el recipiente que contiene el fluido. La diferencia en el peso (o el diámetro) de la bola desgastada es una medida de la lubricidad del fluido. Si bien la normativa no exige la determinación de la lubricidad, podría hallarse de la misma manera al diesel. El biodiesel aumenta considerablemente la lubricidad del diesel debido a su bajo contenido de azufre (Demirbas, 2007).

### **3. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1 Ubicación del experimento**

La fase de campo se llevó a cabo entre los meses de Agosto de 2010 y Diciembre de 2011 en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, campus Marín, ubicada a 25° 52' 23' latitud norte y 100° 02' 42" de longitud oeste a 355 msnm.

#### **3.2 Obtención de germoplasma**

El germoplasma se obtuvo a base de colectas en diferentes partes de la región noreste, con el fin de obtener material genético endémico; además, se obtuvo semilla del INIFAP y particulares, con el fin de obtener una muestra más variada en cuanto a diversidad genética.

#### **3.3 Caracterización molecular de la higerilla**

Se realizaron análisis con distintos iniciadores utilizando la técnica de RAPDs, esta técnica permitió diferenciar el material colectado con el fin de establecer características distintivas de cada una de ellas y formar grupos comunes en su caso.

Este análisis se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía Campus Escobedo bajo la siguiente metodología:



### **3.3.1 Definición del Protocolo para la caracterización molecular de la higuera.**

Semillas de higuera de los genotipos C1M9, C2M1, C2M2, C2M3, C2M4, C2M5, C2M6, C2M7, C2M8, SLP02, SLP03, SLP04, SLP05, SLP06, SLP07, SLP08, SLP09, SLP10 y SLP11 se sembraron, después de 30 días de la siembra y cuando las plántulas habían emergido y tenían en promedio 10 cm de altura, se colectó el material vegetativo, cortando las hojas primarias de las plántulas obtenidas. Para esto, se cortaron mitades de hoja dejando las otras mitades con el fin de no defoliar por completo las plántulas.

El material se puso en hielo seco y se transportó al laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía en el Campus Escobedo, donde se colocaron a -70° C en el ultracongelador hasta su posterior análisis.

Para el análisis de las muestras se pesaron 100 mg de hoja de cada una de las diferentes colectas y se procedió a la extracción de ADN por medio del método MasterPure™ Plant Leaf DNA (Jasbeer *et al.*, 2009; Anexo 1).

Ya extraído el ADN, se procedió a cuantificar su calidad y cantidad por medio del Thermo Scientific NanoDrop 2000, para posteriormente elaborar el ADN molde de cada muestra a una concentración de 20 ng/μl. Los moldes, fueron alícuotas que contenían la misma cantidad de ADN y se utilizaron en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la multiplicación del material genético extraído.

Una vez preparado el molde, se llevó a cabo la PCR, para lo cual se requirió la preparación de un coctel de reactivos necesarios para la multiplicación del ADN, teniendo un volumen de reacción de 25 μl, el cual se muestra en el Cuadro 3.

**Cuadro 3. Reactivos utilizados en la técnica de PCR**

<b>Reactivo</b>	<b>1 Reacción</b>
Solución Amortiguadora Taq	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub>	2.5 µl
Mezcla de Deoxinucleotidos	0.1 µl
Enzima Taq Polimerasa	0.2 µl
Iniciador	5 µl
Agua	13.7 µl
TOTAL	25 µl

Una vez preparadas las muestras, se colocaron en un termociclador de la marca Thermo Hybaid, modelo PCR Express Thermal Cycler. El programa térmico fue un ciclo inicial de 93°C, 45 ciclos de 92°C, 1 min; 36 °C, 1 min; 71°C, 1 min y un ciclo final de 72°C, 5 min. Una vez obtenido el producto de la PCR, se llevó a cabo la elaboración del gel de agarosa a una concentración de 1% el cual se utilizó como medio para la visualización de los productos de amplificación.

El gel se preparó con 150 ml de buffer TE y 1.5 g de agarosa, fundiéndolo en el horno de microondas con el fin de disolver la agarosa en el Buffer TE, para posteriormente verterse en una cámara de electroforesis de la marca BioRad con capacidad de procesar 50 muestras con una dimensión de 25 x 15 cm. Preparado el gel, se cargaron las muestras depositando 4 µl en cada uno de los pozos del gel, utilizando para ello la mezcla que incluía 0.16 µl de Buffer de carga 5X Green Go Taq Flexi Buffer de la marca Promega por cada microlitro del volumen de reacción de la muestra. Una vez cargado el gel, se llevó a cabo la electroforesis a 60 Volts durante 30 minutos.

Para la definición del protocolo se realizaron pruebas preliminares para determinar los materiales que dieran como resultado productos de

amplificación con una mejor definición, estas pruebas se realizaron utilizando el total de muestras disponibles y los iniciadores OPG08, OPG19, OPA04, OPA07 y OPA08.

Se cargaron cuatro geles, los cuales se utilizaron para la definición del protocolo, de cuales dos fueron elaborados con el material genético procedente del estado de México (EdoMex) y dos más con material genético procedente del estado de Chihuahua, utilizando la serie de iniciadores OPA (01-20) y OPG (01-20). Para cada uno de los diferentes geles elaborados, se colocó un testigo positivo, el (EdoMex) cual consistió de una combinación de ADN procedente del Estado de México y el iniciador OPG 08 previamente utilizado y que da como resultado productos de amplificación. El testigo positivo permitió validar el procedimiento de PCR debido a que se trató de una combinación previamente utilizada, de modo que cualquier carril que no presentara productos de amplificación, no fuera por un error en la técnica o el manejo de las muestras. Además, se utilizó también un testigo negativo, el cual fue una muestra con el iniciador pero sin ADN, esto con el fin de constatar que las diversas bandas de amplificación producidas fueron el resultado del acoplamiento entre el ADN y el iniciador y no debido a la contaminación de las muestras. Finalmente, a ambos extremos del gel se utilizó el marcador molecular 100 bp Ladder DNA Marker (100-3000 bp) de la marca Axygen.

Los geles elaborados se colocaron en una solución de tinción al 0.01% preparada con Orange Cybr y agua bidestilada durante 45 minutos para así poder ser visualizados en el fotodocumentador (Loaeza *et al.*, 2011).

### **3.3.2 Caracterización molecular de la higuera utilizando la técnica de PCR-RAPD.**

Una vez definido el protocolo para la caracterización, se aplicó utilizando los 18 diferentes genotipos y las series A y G de los iniciadores OP de Operon

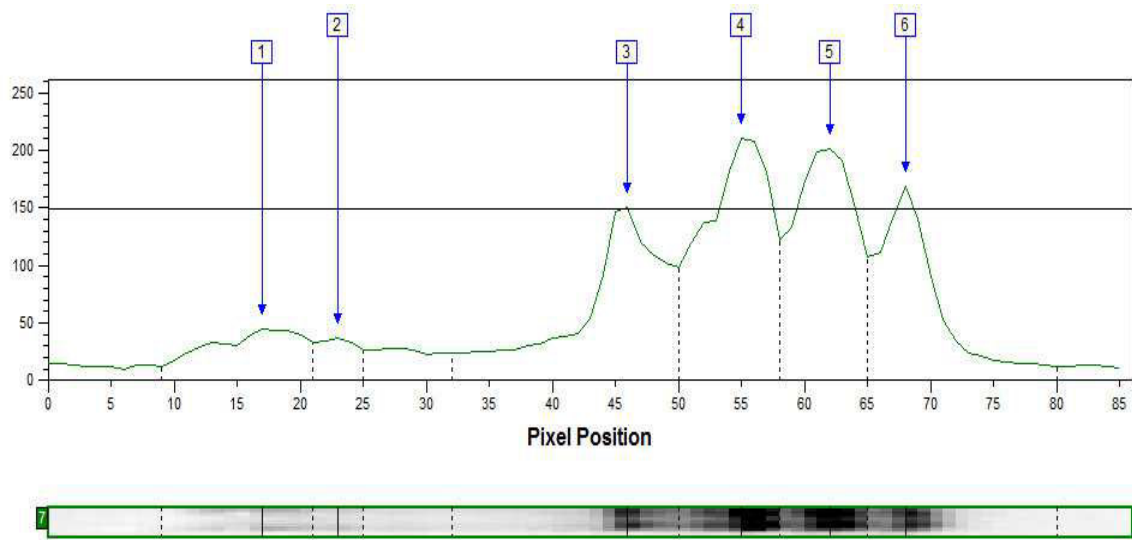
Technologies (Alameda, CA, USA), los cuales se muestran en el Cuadro 4, con sus respectivas secuencias.

**Cuadro 4. Series de iniciadores utilizadas para la diferenciación molecular del material genético y sus diferentes secuencias.**

<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia</b>
OPA-01	CAGGCCCTTC	OPG-01	CTACGGAGGA
OPA-02	TGCCGAGCTG	OPG-02	GGCACTGAGG
OPA-03	AGTCAGCCAC	OPG-03	GAGCCCTCCA
OPA-04	AATCGGGCTG	OPG-04	AGCGTGTCTG
OPA-05	AGGGGTCTTG	OPG-05	CTGAGACGGA
OPA-06	GGTCCCTGAC	OPG-06	GTGCCTAACC
OPA-07	GAAACGGGTG	OPG-07	GAACCTGCGG
OPA-08	GTGACGTAGG	OPG-08	TCACGTCCAC
OPA-09	GGGTAACGCC	OPG-09	CTGACGTCAC
OPA-10	GTGATCGCAG	OPG-10	AGGGCCGTCT
OPA-11	CAATCGCCGT	OPG-11	TGCCCGTCGT
OPA-12	TCGGCGATAG	OPG-12	CAGCTCACGA
OPA-13	CAGCACCCAC	OPG-13	CTCTCCGCCA
OPA-14	TCTGTGCTGG	OPG-14	GGATGAGACC
OPA-15	TTCCGAACCC	OPG-15	ACTGGGACTC
OPA-16	AGCCAGCGAA	OPG-16	AGCGTCCTCC
OPA-17	GACCGCTTGT	OPG-17	ACGACCGACA
OPA-18	AGGTGACCGT	OPG-18	GGCTCATGTG
OPA-19	CAAACGTCCG	OPG-19	GTCAGGGCAA
OPA-20	GTTGCGATCC	OPG-20	TCTCCCTCAG

Se realizaron 20 geles, cada uno con dos series de iniciadores y se analizaron a través de fotografías tomadas con un fotodocumentador de la marca UVP, modelo BioDoc-It Imaging System; posteriormente se utilizó el programa computacional TotalLab Quant para conocer los tamaños de las bandas amplificadas y saber si se trata de bandas polimórficas, además de poder determinar cuáles podían ser consideradas como marcadores.

Para la determinación de los marcadores, durante el análisis visual de las imágenes, se llevó a cabo la elaboración de gráficas de posición de píxeles (Figura 8), las cuales permitieron conocer que productos de amplificación tenían una mayor definición (en cuanto a forma y brillo),



**Figura 8. Grafica de Posición de Pixeles utilizada para la definición de marcadores moleculares.**

Finalmente, con base en los datos obtenidos del análisis de las imágenes se pudo generar una matriz de datos binaria (0,1), con la cual se pudo elaborar un dendrograma utilizando el paquete computacional Statistica Ver. 7, el cual permitió diferenciar las colectas en base a sus diferencias genéticas. Para este análisis se utilizó el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) debido a que se trata de un método espacio-conservativo, esto es, no hace variar considerablemente la métrica inicial, y resulta ser uno de los más utilizados.

Además, con base en estos mismos datos se obtuvo el índice de diversidad, el cual se calculó sumando los valores de cada una de las filas que representa cada iniciador dentro de la matriz; posteriormente, el resultado de la suma se divide entre el total de muestras analizadas y se eleva al cuadrado. Posteriormente, se resta este valor a 1 obteniéndose el índice de diversidad para cada uno de los iniciadores, finalmente se promedian todos los índices calculados, lo cual da como resultado el índice de diversidad de la población. El cálculo se realizó utilizando la fórmula de Nei (H).

$$H = 1 - \sum p_i^2$$

Donde:

- H= Índice de diversidad genética o Coeficiente de Nei.
- $p_i$ = Frecuencia media del alelo  $i$  en los loci considerados.

Arif *et al.* (2010) y Sujatha *et al.* (2008) mencionaron que dentro de las diferentes técnicas disponibles para la caracterización molecular, la técnica de RAPDs es de bajo costo, rápida y sobre todo no necesita de una excelente calidad del ADN, además de no necesitar información genómica previa, razón por la cual se utilizó esta técnica en la presente investigación.

### **3.4 Determinación del Periodo de Latencia, Dinámica de Emergencia y Porcentaje de Plantas Germinadas.**

Para la determinación del Periodo de Latencia, Dinámica de Germinación y Porcentaje de Plantas Germinadas se llevo a cabo con la segunda siembra del material, se utilizaron 22 materiales de las colectas anteriormente mencionadas, se llevo a cabo la revisión periódica de las charolas y la posteriormente se comenzó a contar el número de plantas emergidas una vez que se considero el periodo de latencia de 20 días.

#### **3.4.1 Siembra**

La primera siembra se realizó el día 20 de Agosto del año 2010, utilizándose material de la primera colecta, de las cuales se sembraron los materiales con la identificación C1M1, C1M2, C1M3, C1M6, C1M7, C1M8 y C1M9, debido a que

solo de estas colectas se alcanzó material suficiente para la siembra. Esta se realizó en un sustrato hecho con 1/3 de pette moss, 1/3 de arena de río y 1/3 de tierra normal como puede observarse en la Figura 9. Las plantas obtenidas para esta primera siembra fueron trasplantadas a campo, utilizándolas como barrera en la siembra directa.



**Figura 9. Realización de la primera siembra.**

La segunda siembra se realizó el día 23 de Diciembre del año 2010, utilizando cajas de germinación plásticas y de unicel, utilizando un sustrato compuesto por  $\frac{1}{2}$  de Perlita y  $\frac{1}{2}$  de tierra negra. Para esta segunda siembra se utilizaron las colectas procedentes del estado de Chihuahua, San Luis Potosí y del Estado de México, además de las colectas C1M9, C2M1, C2M2, C2M3, C2M4, C2M5, C2M6, C2M7, C2M8, SLP02, SLP03, SLP04, SLP05, SLP06, SLP07, SLP08, SLP09, SLP10 y SLP11.

Para la siembra, las semillas se hidrataron durante 24 horas y se les aplicó fungicida para evitar problemas de hongos, se estableció como parámetro 20 días de latencia después de la siembra y se comenzó con la determinación de la dinámica de emergencia de las diferentes colectas utilizadas (Figura 10).



***Figura 10. Plantas utilizadas para la determinación del periodo de latencia, porcentaje de plantas germinadas y dinámica de emergencia.***

Debido a las condiciones climáticas presentadas durante los primeros días del mes de Febrero del año 2011, todas las plantas de la segunda siembra, a excepción de la colecta del estado de Michoacán, se vieron afectadas, presentándose la muerte de la mayoría de la población debido a que durante este periodo se presentaron temperaturas mínimas que alcanzaron los  $-8^{\circ}\text{C}$  (Figura 11).



***Figura 11. Daño provocado por el frío en las plántulas de higuera***

### **3.4.2 Determinación del Periodo de Latencia.**

El periodo de latencia se determinó contabilizando los días entre la siembra y la germinación de las plantas anteriormente sembradas.



### **3.4.3 Determinación de la Dinámica de Emergencia.**

Para la determinación de la dinámica de emergencia de las colectas de higuierilla se contabilizaron el número de plantas durante 50 días.

### **3.4.4 Determinación del Porcentaje de Plantas Germinadas.**

Para determinar el porcentaje de plantas germinadas se contabilizaron el total de plantas, considerando el total de semillas sembradas como el 100%, se calculó el porcentaje.

## **3.5 Evaluación de genotipos a nivel de campo.**

### **3.5.1 Genotipos.**

Se utilizaron solo 17 colectas de higuierilla debido a la poca disponibilidad de la misma, las colectas utilizadas fueron: Chi02, Chi01, C2M6, SLP04, SLP10, C2M7, SLP06, SLP03, C1M3, C1M6, SLP05, SLP11, SLP02, C2M1, C2M4, C1M1 y EdoMex.

### **3.5.2 Fecha de siembra y tamaño de la parcela experimental.**

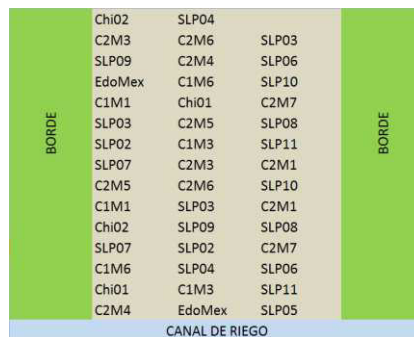
Para la evaluación de genotipos a nivel de campo se llevó a cabo una tercera siembra, la cual se realizó en el campo experimental de Marín, perteneciente a la Facultad de Agronomía de la UANL el día 2 de Abril del 2011; se sembró de manera directa, a tierra venida, regándose el día 31 de Marzo del año 2011 (Figura 12). Además, se realizó el trasplante de las plantas de la colecta del

estado de Michoacán que sobrevivieron a la helada de principios de año y las plantas de la primera siembra.



**Figura 12. Siembra de higuera en campo**

Los 17 genotipos utilizados se sembraron en unidades experimentales de 9 m<sup>2</sup>, distribuidas aleatoriamente en el terreno (Figura 13); cada una de estas fueron de 2 surcos de 5 m de largo con solo 2 repeticiones debido a la poca cantidad de semilla disponible, la distancia entre surcos fue de 1.8 m y la distancia entre plantas de 0.5 m, teniendo una densidad de siembra de 11,111 plantas ha<sup>-1</sup> (Se considero esta densidad, debido a que CORPOICA recomienda densidades de siembra de 10,000 a 15,000 plantas por hectárea en sistemas de producción comerciales).



**Figura 13. Croquis de distribución de las unidades experimentales en el terreno.**

### **3.5.3 Prácticas de cultivo**

#### **3.5.3.1 Riego**

El cultivo se regó una vez por semana durante los primeros dos meses después de establecido el cultivo en campo. Este se realizó de manera rodada.

#### **3.5.3.2 Control de malezas**

Debido a que se presentó una gran cantidad de malezas, se llevó a cabo su control de forma manual y periódica. Este control manual se llevó a cabo cada 15 días, con el fin de minimizar al máximo la competencia de las malezas con el cultivo; además, de esta manera el trabajo se realizaba de manera más eficiente debido a que se reducía periódicamente la cantidad de maleza presente.

### **3.5.4 Toma de datos**

#### **3.5.4.1 Días a floración.**

Dentro de las mediciones que se llevaron a cabo en campo, la primera fue la determinación de los días a la primera floración, esta medición se realizó monitoreando cada tres días los diferentes genotipos con el fin de determinar el inicio de la floración; se consideró que había comenzado el periodo reproductivo de la planta cuando en la yema apical, se pudieran observar estructuras reproductivas (Figura 14).



***Figura 14. Yema apical que muestra el momento del inicio de la floración.***

#### **3.5.4.2 Altura.**

Posteriormente se midió la altura de planta (cm) a la primera floración, la cual consistió en la medición de la planta del nivel del suelo hasta la base de la yema apical.

#### **3.5.4.3 Número de hojas.**

El número de hojas se obtuvo contabilizando el total de hojas que había al momento del inicio de la floración.

#### **3.5.4.4 Tipo de Fruto.**

Se determinó si se trataba de un fruto ya sea dehiscente o indehiscente al momento de la cosecha.

#### **3.5.4.5 Tamaño de la semilla.**

La medición de las dimensiones de las semillas se llevo a cabo midiendo dos grupos de 100 semillas cada uno de las diferentes colectas, dicha medición se realizo con un calibrador analógico estándar de la marca Trupper (Figura 15).



*Figura 15. Medición de las dimensiones de las semillas.*

#### **3.5.4.6 Características Físicas del Fruto.**

Se determinó si se trataba de frutos con espinas punzantes o no punzantes (porcentaje de frutos punzantes), además de determinarse la persistencia de la cutícula que cubre las capsulas de los frutos, debido a que se pudo observar que existían diferencias entre cada una de las diferentes colectas.

#### **3.5.4.7 Rendimiento de semilla ( $\text{kg ha}^{-1}$ ).**

Para la obtención de los datos de rendimiento, primero se peso la semilla producida en una bascula de la marca Mittler Toledo por cada uno de los diferentes individuos, posteriormente se descartaron aquellos individuos que no presentaban competencia completa (plantas en los extremos de los surcos o aquellas que no tuvieran plantas a su lado a lo largo del surco) y finalmente se

hizo un promedio de los individuos con el fin de conocer la producción por hectárea de cada una de las diferentes colectas.

#### **3.5.4.8 Variables Cualitativas**

Con respecto a variables cualitativas, se consideró importante incluir el color del tallo, de la nervadura y de las hojas; se llevó a cabo considerando los colores existentes entre los diversos genotipos. Para color de tallo se consideraron los colores verde, rojo y mixto, debido a que estos tres colores (que pueden observarse en la Figura 16) fueron los únicos que se presentaron. Para el color de la nervadura se consideraron nervaduras de colores amarillas y rojas, en tanto que para el color de las hojas se tomó en cuenta el color verde, el rojo y el mixto.



*Figura 16. Distintos tipos de color de tallo; verde (1), rojo (2) y mixto (3).*

#### **3.5.5 Extracción y producción de aceite**

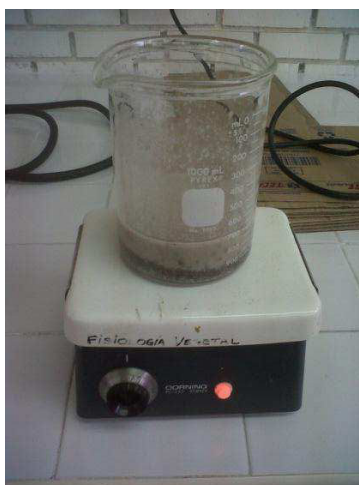
La extracción de aceite se realizó por medio de solventes a partir de la semilla cosechada y consistió en los siguientes pasos:

1. Se pesaron 10 gramos de semillas, las cuales se molieron a velocidad baja (con una licuadora industrial, de la marca Waring) y posteriormente transferidas a un acondicionador donde se obtuvo una masa homogénea (Figura 17).



***Figura 17. Proceso de molienda de las semillas de Higuierilla.***

2. Posteriormente, dicha masa se sometió a agitación constante a una velocidad de 700 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente, utilizando metanol como solvente en una relación de 3:1 (Figura 18).



***Figura 18. Proceso de agitación con metanol de las semillas previamente molidas.***

3. Una vez transcurrido el tiempo, se llevó a cabo la filtración del material con papel filtro Whatman Grado 1 y embudos de cristal de la marca Pyrex, para separar los residuos sólidos de la solución Metanol: Aceite producida durante la agitación del material (Figura 19).



***Figura 19. Proceso de filtración del metanol y aceite en dilución.***

4. Finalmente, para la extracción del aceite se realizó la evaporación del Metanol a 70°C durante 24 horas, lo cual aseguró la evaporación total del Metanol (Figura 20).



***Figura 20. Proceso de evaporación de metanol.***



Ya hecha la extracción se evaluó la cantidad de aceite producida por cada una de las diferentes variedades pesando el aceite obtenido y haciendo la relación con el peso inicial de las semillas; en base a esto, se determinó la capacidad de las variedades para la producción de aceite.

### 3.5.6 Análisis estadísticos.

Para el análisis de los datos se utilizó un diseño de bloques completos al azar con el modelo que se muestra a continuación:

$$Y_{ij} = \mu + C_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$
$$i = 1, 2, \dots, 17$$
$$j = 1, 2.$$

donde:

$Y_i$	es la observación de la variedad $i$ en la repetición $j$ .
$\mu$	es el efecto verdadero de la media general.
$C_i$	es el efecto de la $i$ -ésima colecta.
$\beta_j$	el efecto del $j$ -ésimo bloque.
$\epsilon_{ij}$	es el error experimental de la $ij$ -ésima observación.

El modelo estadístico mencionado, generó una tabla de análisis de varianza (ANVA) como se presenta en el Cuadro 5.

**Cuadro 5. Tabla de ANVA de un diseño de bloques completos al azar.**

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>E(CM)</b>
Colecta	(t-1)	$b \sum_{i=1}^t (\bar{y}_i - \bar{y}_{..})^2$	$SC_{colecta}/(t - 1)$	$\frac{CM_{trat}}{CM_E}$	$\sigma^2 + b \sum_{i=1}^t$
Bloque	(b-1)	$t \sum_{j=1}^b (\bar{y}_j - \bar{y}_{..})^2$	$SC_{bloque}/(b - 1)$		
Error	(t-1)(b-1)	$\Sigma\Sigma(y_{ij} - \bar{y}_i - \bar{y}_j + \bar{y}_{..})^2$	$SC_E/(t - 1) (b - 1)$		$\sigma^2$
Total	bt-1	$\Sigma_i \Sigma_j (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_{..})^2$			
t=17	b=2				

Donde:

FV: Fuente de Variación.

GL: Grados de Libertad.

SC: Suma de Cuadrados.

CM: Cuadrados Medios.

Para el caso donde la prueba F mostró significancia se realizo la comparación de medias a través del método de Tukey debido a la alta sensibilidad de esta prueba.

Finalmente, una vez obtenidos los datos se llevo a cabo la generación de dendrogramas a través de un análisis de conglomerados, utilizando el método de Ward, para la clasificación de las diferentes colectas. Se decidió utilizar este tipo de análisis con el fin de llevar a cabo una agrupación de los diversos materiales en base a los datos morfológicos obtenidos y de esta manera determinar los grupos similares que presenten características deseables para la producción a gran escala.

### 3.6 Producción de Biodiesel

Una vez extraído el aceite, se llevó a cabo la elaboración de biodiesel con la utilización de un bioreactor o sistema de reacción con agitador magnético y un sistema de refrigeración a base de agua.

La transesterificación del aceite es un proceso fundamental en la producción de biodiesel, se decidió ensayar en primer lugar con diferentes aceites, procedentes de otras fuentes más comunes, como el aceite de maíz.

En la literatura, existe una gran cantidad de diferentes metodologías empleadas para la transesterificación del biodiesel, por ejemplo Lozada y Velázquez (2009) reportan que los mejores resultados para la transesterificación se dan con una concentración de NaOH de 0.23%w/w, temperatura de reacción de 55°C y una relación volumétrica alcohol/aceite de 1.35, en cambio Pradhan *et al.* (2012) reportaron que la más alta eficiencia en la producción de biodiesel se da con una concentración molar de 225:1 metanol/aceite y una concentración de catalizador del 1% w/w. El primer ensayo se llevo a cabo siguiendo la metodología reportada por Benavides *et al.* (2007) utilizando una relación metanol/aceite de 9 y un 0.8% en peso de NaOH

Para este proceso se utilizó metanol y NaOH (como catalizador) para la reacción de transesterificación; el procedimiento consistió en la preparación de una solución de metanol y NaOH o metóxido, la cual se preparó agregando 25% de Metanol en relación al volumen de aceite que se transesterificó y una relación del 0.5% w/w de NaOH/Aceite. Se depositaron 100 g de aceite de ricino dentro del bioreactor, el cual estaba conformado por una plancha de agitación con placa de calentamiento de la marca Corning, un Matraz de Bola de 500 ml de la marca Pyrex y un sifón de enfriamiento de la marca Pyrex (Figura 21) y posteriormente se agrego la mezcla de Metanol y NaOH.



**Figura 21. Biorreactor para la producción del Biodiesel**

La reacción de transesterificación se realizó durante dos horas a 60°C y 700 rpm del agitador provocando la separación de la glicerina y las cadenas de ácidos grasos, con lo cual se observa una separación de fases, la cual puede observarse en la Figura 22.



**Figura 22. Separación de fases al final de proceso de transesterificación**

Finalmente, se realizó la purificación del biodiesel, primero a través de un embudo de decantación para separar el glicerol formado durante la reacción de transesterificación y posteriormente se realizaron dos lavados con agua desionizada colocando el biodiesel en el matraz de decantación y agregando el

agua a 60°C, posteriormente se eliminó esta agua por medio de decantación y evaporación a 70°C durante 10 minutos.

### **3.7 Análisis Molecular de la Calidad del Biodiesel**

La fase experimental para la determinación molecular de la calidad del biodiesel de Higuierilla se realizó en el laboratorio del grupo de investigación de Combustibles y Motores de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de la Universidad de Castilla la Mancha, ubicada en Ciudad Real, España. Se hicieron diferentes análisis los cuales se describen a continuación.

#### **3.7.1 Determinación del Contenido de Agua**

Para llevar a cabo la determinación del contenido de agua, se siguió el procedimiento de la Norma EN ISO 12937 utilizando el método Karl Fischer por valoración coulombimétrica. Se utilizó un aparato coulombimétrico de la marca Metrohm, modelo 831 KF Coulometer, el cual se muestra en la Figura 23.



***Figura 23. Aparato coulombimétrico utilizado para la determinación del contenido de agua.***

En este aparato se generó coulombimétricamente yoduro en el ánodo, una vez valorada la cantidad de agua presente, el exceso de yoduro se detectó

mediante un sensor de punto final electrométrico. Basándose en la estequiometría de la reacción, un mol de yoduro reacciona con un mol de agua, por lo que la cantidad de agua es proporcional a la cantidad total de corriente de acuerdo a la ley de Faraday.

El procedimiento consistió en la inyección de muestra (previamente pesado) dentro del vaso de valoración, el cual contenía reactivo de Karl Fischer; posteriormente el aparato realizó la valoración correspondiente para determinar la cantidad de agua presente en la muestra.

La cantidad de agua es un factor importante de calidad en los combustibles, debido a que altas concentraciones (superiores a 0.05 g/100 g) provocan corrosión de los componentes del sistema de inyección, además de también contribuir obstrucciones de los filtros.

### 3.7.2 Determinación de la Densidad (Experimental)

La densidad se determinó siguiendo el procedimiento de la Norma EN ISO 3675 utilizando un areómetro de vidrio graduado a 15°C. Se logró mantener la temperatura utilizando un baño TAMSON modelo TV2000 con una resistencia de enfriamiento (Figura 24).



**Figura 24. Baño de temperatura regulada utilizado para la determinación de la Densidad.**

El método consistió en colocar la muestra en una probeta de vidrio, la cual se colocó dentro del baño; después de 15 minutos, ya estabilizada la muestra en la temperatura deseada, se colocó el areómetro y se realizó la lectura (Figura 25).



*Figura 25. Areómetro dentro de la muestra previo a la lectura de la densidad.*

### **3.7.3 Determinación de la Viscosidad**

Para llevar a cabo la determinación de la viscosidad se realizó conforme a la norma EN ISO 3104, en dicha norma se establece el método, el cual consistió en colocar la muestra en un Viscosímetro de Ostwald a temperatura constante (40°C), con el fin de determinar la viscosidad cinemática. La metodología incluyó la medición del tiempo en que un volumen determinado de líquido fluye por gravedad por el capilar de un viscosímetro calibrado con una columna reproducible y a una temperatura conocida y perfectamente controlada. La muestra se colocó dentro del viscosímetro haciendo llegar la muestra hasta la marca B (parte inferior del viscosímetro). Finalmente se hizo llegar la muestra hasta la marca A (parte superior del viscosímetro). La medición del tiempo inició en la marca A y finalizó cuando la muestra cruza la marca B. La viscosidad cinemática es el producto del tiempo de fluencia medido y la constante de calibración del viscosímetro. Se logró mantener la temperatura utilizando un baño TAMSON modelo TV2000, como puede observarse en la Figura 26.



***Figura 26. Viscosímetro de Ostwald utilizado para la determinación de la viscosidad cinemática.***

La determinación de la viscosidad es muy importante dentro de los estándares de calidad de los combustibles, debido a que ésta afecta directamente el funcionamiento de la bomba y el sistema de inyección, además de ejercer una gran influencia sobre la forma de pulverización de las partículas.

#### **3.7.4 Determinación del Índice de Acidez**

La determinación del Índice de Acidez se realizó en base a la norma UNE-EN 14104 utilizando un Titulador de la marca Metrohm modelo 720 SM Titrino, el cual puede observarse en la Figura 27.





*Figura 27. Titulador utilizado para la determinación del Índice de Acidez.*

El método consistió en pesar 10 gramos de muestra y diluirlos con solvente (etanol y dietil éter con una proporción de 1:1) y posteriormente colocarlos dentro del vaso de reacción y titulándose con Hidróxido Potásico. El aparato, de manera automática, arrojó el dato de Índice de Acidez.

La importancia en la determinación del índice de acides reside principalmente en su relación con la degradación del combustible, además de que puede indicar una tendencia a la corrosión de materiales.

### **3.7.5 Determinación del Punto de Obstrucción de Filtro Frio (POFF)**

Para la determinación del Punto de Obstrucción de Filtro Frio se siguió la metodología de la norma EN 116; para esto se utilizó un Analizador Automático de Punto de Obstrucción de Filtro Frio de la marca ISL, modelo FPP5 GS, el cual se observa en la Figura 28.



**Figura 28. Analizador Automático del Punto de Obstrucción de Filtro Frio utilizado.**

La prueba consistió en colocar las diferentes muestras de biodiesel (tanto B100, como B05, B10, B15 y B20) dentro del analizador en el vaso de reacción; este aparato funciona haciendo pasar la muestra a través de un filtro metálico de 32  $\mu\text{m}$  hasta llegar a un sensor óptico en la parte superior, dicha medición se realizo a partir de los 15°C, disminuyendo un grado hasta que la muestra superó el tiempo establecido (1 min) para llegar al sensor superior.

Es importante la determinación del POFF debido a que esta prueba determina la temperatura a la cual los filtros se obstruyen debido a la congelación del combustible.

### **3.7.6 Determinación de la Temperatura Mínima de Estabilidad de la Mezcla**

Debido a que durante las pruebas de POFF de mezclas diesel-biodiesel se observo que la mezcla perdía estabilidad a bajas temperaturas, se llevo a cabo la determinación de la Temperatura Mínima de Estabilidad de la Mezcla. Esta

prueba consistió en la disminución gradual de la temperatura hasta que la mezcla se separo en las diferentes fases.

Se utilizó un baño frío con refrigerante (Figura 29) con el objetivo de disminuir de manera controlada la temperatura.



**Figura 29. Baño con refrigerante utilizado para disminuir la temperatura de las muestras.**

Una vez enfriada la muestra, se utilizó el analizador de la marca Formulacion, modelo TURBISCAN MA 2000 (Figura 30), una vez alcanzada la temperatura deseada, se colocó dentro del analizador la muestra y se realizó el análisis.



**Figura 30. Analizador TURBISCAN utilizado para el análisis.**

Debido a que durante los ensayos se observó que las distintas mezclas de diesel/biodiesel son inestables a bajas temperaturas, se consideró importante determinar el límite de temperatura a la cual la mezcla es aun estable.

### **3.7.7 Determinación de la composición de Metil Esteres de Ácidos Grasos del Biodiesel (FAMES)**

Para la determinación de los diferentes FAMES presentes en el biodiesel se siguió la metodología descrita por la norma EN 14103. Se utilizó un cromatógrafo de gases de la marca Variant, modelo CP3800 con auto inyector de la misma marca, modelo CP8410, los cuales pueden observarse en la Figura 31.



***Figura 31. Cromatógrafo de gases utilizado para la determinación de FAMES.***

Las muestras se prepararon diluyéndolas en Tolueno (99%) pesando aproximadamente 250 mg y colocándolas en viales de 10 ml, para posteriormente colocar 5 ml de una disolución a 10 mg/ml de heptadecanoato metílico (99%). Se llevó a cabo una prueba en blanco introduciendo en el

cromatógrafo una muestra de la solución de tolueno con heptadecanoato metílico, una vez realizada la prueba blanco se llevo a cabo la cromatografía de las muestras.

Esta prueba es una de las más importantes en relación a la calidad de los biocombustibles, debido a que las concentraciones de FAMES determinan las propiedades del mismo, además de que estos datos son utilizados para la estimación teórica de diversos parámetros.

### 3.7.8 Determinación de la Densidad (Teórica)

La estimación teórica de la densidad a 15°C se hizo en base a la ecuación propuesta por Lapuerta *et al.* (2010), la cual calcula la densidad en función del número de átomos de carbono y oxígeno y el número de dobles enlaces presentes en el acido graso original:

$$\rho_{15^{\circ}} = 847.712 + \frac{274.883 \text{ de} + 950(o - 2) + 312.149}{1.307 + c}$$

Donde:

*c*: Numero de Átomos de Carbono del Ácido.

*de*: Numero de Dobles enlaces del Ácido.

*o*: Numero de Átomos de Oxígeno del Ácido.

Una vez obtenidos los datos de la cromatografía, se obtuvo la cantidad de átomos que componen cada una de las diferentes colectas de Higuierilla. Finalmente se realizo la suma ponderada de cada uno de los diferentes esteres metílicos utilizando la siguiente fórmula:

$$\rho = \frac{1}{\sum Y_P \frac{1}{\rho_P}}$$

El cálculo de la densidad se realizó en base a los datos de la cromatografía obtenida de cada uno de las diferentes colectas, debido a que todas presentaron diferentes porcentos de ácidos grasos.

### 3.7.9 Determinación del Índice de Yodo

Se realizó el cálculo del índice de Yodo con base en la metodología de la Norma EN 16300, donde se establece la siguiente fórmula:

$$IY = \frac{3PM_{I_2} de}{PM_{Aceite}}$$

Donde:

$3PM_{I_2}$  : Peso Molecular del  $I_2$  ( $253.8089 \frac{g}{mol}$ ).

$PM_{Aceite}$ : Peso Molecular del Aceite.

$de$  : Dobles enlaces presentes.

Debido a que no se conoce el peso molecular del aceite, se procedió a su cálculo; la estructura química de un triglicérido se basa en la unión de tres ácidos grasos ( $RCOOH$ ,  $R'COOH$  y  $R''COOH$ ) y una estructura carbonosa, formada por tres átomos de carbono; de esta estructura se puede deducir el PM del aceite en base a la siguiente ecuación:

$$PM_{Aceite} = 3(PM_{Acido}) + 3(PM_C) + 2(PM_H)$$

El cálculo del Índice de Yodo se realizó en base a los datos de la cromatografía obtenida de cada uno de las diferentes colectas, debido a que todas presentaron diferentes porcentos de ácidos grasos.

Esta determinación es importante debido a que el índice de yodo está relacionado con el comportamiento del combustible durante su almacenamiento, además de que cuantifica su estabilidad hidrolítica y oxidativa.

### 3.7.10 Determinación del Peso Molecular del aceite, ácido graso y biodiesel

Una vez obtenidos los datos de la cromatografía de gases; conociendo la fracción másica que representa cada éster metílico así como su peso molecular, se pudo calcular el peso molecular medio del biodiesel utilizando la siguiente ecuación:

$$PM_b = \frac{\sum m_p}{\sum n_p} = \frac{1}{\sum \frac{Y_p}{PM_p}}$$

Donde:

p: Subíndice que define al éster.

b: Subíndice que define al biodiesel.

m: Masa.

n: Moles.

Y: Fracción másica.

Estos cálculos se realizaron con los resultados de la cromatografía de cada una de las diferentes colectas de Higuierilla.

### 3.7.11 Determinación de la composición atómica del biodiesel

Para la determinación de la composición atómica del biodiesel, se calculo primero la fracción molar (X) de cada éster, el cálculo se realizó una vez hallado el valor del peso molecular del biodiesel puro utilizando la ecuación siguiente:

$$X_p = \frac{n_p}{n_b} = Y_p \frac{PM_b}{PM_p}$$

Una vez obtenidas las fracciones molares de cada éster, se puede calcular el número de átomos de carbono (c), hidrogeno (h) y oxígeno(o) utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} c &= \sum_{p=1}^n c_p X_p \\ C_c H_h O_o &= h = \sum_{p=1}^n h_p X_p \\ o &= \sum_{p=1}^n o_p X_p \end{aligned}$$

A partir del peso y la formula molecular del biodiesel se pudo estimar la composición elemental del biocombustible utilizando las ecuaciones siguientes:



$$Y_{C,b} = \frac{m_C}{m_b} = \frac{(c.PM_C)}{PM_b}$$

$$Y_{H,b} = \frac{m_H}{m_b} = \frac{(h.PM_H)}{PM_b}$$

$$Y_{O,b} = \frac{m_O}{m_b} = \frac{(o.PM_O)}{PM_b}$$

Donde:

$PM_C$ : Peso Molecular del carbono.

$PM_H$ : Peso Molecular del hidrógeno.

$PM_O$ : Peso Molecular del Oxígeno.

### 3.7.12 Determinación del calor específico a presión constante

El calor específico a presión constante ( $C_p$ ) se calculó de forma teórica utilizando el método de contribución de grupos Joback, propuesto por Reid *et al.* (1987), en el cual el calor específico se calcula a través de una relación polinómica definida a través de cuatro coeficientes, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$C_p(T) = A + B.T + C.T^2 + D.T^3$$

Para determinar los coeficientes que definen la ecuación anterior, se deben calcular en primer lugar los coeficientes correspondientes a cada éster básico, para lo cual se consideró la cantidad de unidades de los distintos grupos químicos presentes en la molécula de cada éster y su valor de contribución; dichos valores se calcularon con las siguientes ecuaciones propuestas por Reid *et al.* (1987):

$$A_i = \sum N_j \cdot A_j - 37.93$$

$$B_i = \sum N_j \cdot B_j + 0.21$$

$$C_i = \sum N_j - 3.91^{-4}$$

$$D_i = \sum N_j + 2.06^{-7}$$

Donde:

j: Subíndice que define al grupo químico.

i: Subíndice que define al éster.

Nj: Numero de cada grupo químico j presente en cada éster.

El cálculo se realizó ponderando con respecto a las fracciones molares que definen la composición del biodiesel. Además, se llevo a cabo la medición del  $C_p$  y su variación con relación a la temperatura.

### 3.7.13 Determinación de la Entalpia de Formación

La entalpia de formación de un compuesto ( $h_f$ ) se define como el cambio de entalpia que lleva asociado el proceso de formación de dicho compuesto a partir de sus elementos básicos, el cálculo de la entalpia de formación estándar ( $h_f^0$ ) se realizó considerando que teóricamente el proceso se lleva a cabo bajo condiciones estándar de presión y temperatura (1 atm y 298.15 K)

El cálculo de la Entalpia de Formación Estándar, se realizó a través del método propuesto por Reid *et al.* (1987) utilizando la contribución de los grupos de Joback; del mismo modo que se calculó el calor específico a presión constante.

Se utilizaron los mismos valores de contribución calculados anteriormente (A, B, C, D y  $\Delta h_f^0$ ) y la siguiente ecuación:

$$h_{f_i}^0 = \sum N_j.$$

Una vez calculada la Entalpia Estándar de Formación y conociendo que existe una relación intrínseca entre la entalpia de formación y el calor específico a presión constante y el comportamiento de  $C_p$  con respecto a la temperatura, es posible calcular el comportamiento de la entalpia de formación con respecto al aumento de la temperatura utilizando la siguiente ecuación:

$$h_f(T) = h_f^0 + \int_{298.15}^T c_p(T) dT = h_f^0 + A(T - 298.15) + \frac{B}{2}(T^2 - 298.15^2) + \frac{C}{3}(T^3 - 298.15^3) + \frac{D}{4}(298.15^4 - T^4)$$

Los cálculos se realizaron para cada una de las muestras de biodiesel analizadas en la cromatografía de gases.

El cálculo de la entalpia de formación estándar es un parámetro que nos permite conocer la cantidad de calor absorbido o desprendido (teórico) por parte del biodiesel y su evolución con respecto a la temperatura.

#### 3.7.14 Determinación de la Entalpia de Vaporización

Para el cálculo de la Entalpia de Vaporización es necesario primero calcular sus propiedades críticas utilizando una vez más: el método de Joback expuesto por

Reid *et al.* (1987), los valores de presión crítica ( $p_c$ ), temperatura crítica ( $T_c$ ) y temperatura de ebullición ( $T_e$ ) de los distintos grupos (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Contribución de los distintos grupos para el cálculo de  $T_e$ ,  $T_c$  y  $p_c$ .**

	$T_e$ (K)	$T_c$ (K)	$p_c$ (K)
No Cíclicos			
> CH –	21.74	$1.64 \cdot 10^{-2}$	$2.00 \cdot 10^{-3}$
–OH	92.88	$7.41 \cdot 10^{-2}$	$1.12 \cdot 10^{-2}$
–CH <sub>3</sub>	23.58	$1.41 \cdot 10^{-2}$	$-1.20 \cdot 10^{-3}$
–CH <sub>2</sub> –	22.88	$1.89 \cdot 10^{-2}$	$0.00 \cdot 10^0$
= CH –	24.96	$1.29 \cdot 10^{-2}$	$-6.00 \cdot 10^{-4}$
–COO –	81.10	$4.81 \cdot 10^{-2}$	$5.00 \cdot 10^{-4}$
Cíclicos			
> CH –	21.78	$1.22 \cdot 10^{-2}$	$4.00 \cdot 10^{-4}$
–CH <sub>2</sub> –	27.15	$1.00 \cdot 10^{-2}$	$2.50 \cdot 10^{-3}$
= CH –	26.73	$8.20 \cdot 10^{-2}$	$1.10 \cdot 10^{-3}$
= C <	31.01	$1.43 \cdot 10^{-2}$	$8.00 \cdot 10^{-4}$

Adaptado de Reid *et al.* (1987)

Con base a la tabla anterior se calcularon los valores de  $T_e$ ,  $T_c$  y  $p_c$  de los distintos esteres metílicos que componen al biodiesel utilizando las siguientes ecuaciones:

$$T_{ei} = \sum N_j \cdot T_{ej} + 198$$

$$T_{ci} = \frac{T_{ei}}{0.584 + 0.965 \sum N_j \cdot T_{cj} - (\sum N_j \cdot T_{cj})^2}$$

$$p_{ci} = \left[ 0.113 + 0.0032 N_{Ati} - \sum N_j \cdot p_{ci} \right]$$

Donde:

$T_e$  : Temperatura de ebullición.

$T_c$  : Temperatura crítica.

$p_c$ : Presión crítica.

$N_{Ati}$ : Número de átomos presentes en el éster.

Una vez obtenidos los parámetros críticos, fue necesario calcular el factor acéntrico crítico ( $\omega_c$ ), el cual, es necesario para el cálculo del factor de compresibilidad, el cual es una variable que expresa el alejamiento de un gas al comportamiento de un gas ideal, su cálculo se realizó mediante la siguiente ecuación, la cual fue propuesta por Pitzer *et al.* (1955):

$$\omega_c = \frac{\left( -\ln\left(\frac{p_c}{1.01325}\right) - 2.97214 + 6.09648 \frac{T_c}{T_e} + 1.28862 \ln\left(\frac{T_e}{T_c}\right) - 0.169347 \left(\frac{T_e}{T_c}\right)^6 \right)}{\left( 15.2518 - 15.6875 \frac{T_c}{T_e} - 13.4721 \ln\left(\frac{T_e}{T_c}\right) + 0.435770 \left(\frac{T_e}{T_c}\right)^6 \right)}$$

Una vez calculado el factor acéntrico crítico ( $\omega_c$ ) se pudo calcular la entalpia de vaporización para el rango  $T_e \leq T \leq T_c$ . La ecuación utilizada es una derivación

de ley de los estados correspondientes incluyendo la desviación respecto de dicha ley a través del actor acéntrico:

$$\Delta h_v(T) = \left( 7.08 \left[ 1 - \left( \frac{T}{T_c} \right)^{0.354} + 10.95 \omega_c \left( 1 - \frac{T}{T_c} \right)^{0.456} \right] \frac{T_c R}{PM_f} \right), \text{ si } T_c \leq T \leq T_e$$

Donde:

$f$ : Subíndice que identifica al biodiesel

R: Constante de los gases.  $R=8.3143 \frac{kJ}{kmolK}$ .

$\omega_c$ : Factor acéntrico.

Debido a que la ecuación anterior sobreestima el valor de entalpia para los valores que se encuentran en el rango  $T < T_e$  se aplica la correlación de Watson combinada con la ecuación de Viswanath y Kuloor (Poling *et al.*, 2000) para el cálculo de  $n$ , las cuales se presentan a continuación:

$$\Delta h_v(T) = \Delta h_v(T_e) \left( \frac{1 - \frac{T}{T_c}}{1 - \frac{T_b}{T_c}} \right)^n, \text{ si } T < T_e$$

$$n = \left( 0.00264 \frac{\Delta h_v(T_e) \cdot PM}{RT_e} + 0.8794 \right)^{10}$$

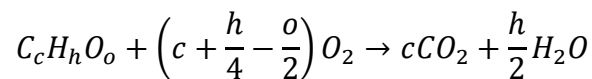
Todos los cálculos anteriores se realizaron para los datos obtenidos en la cromatografía de las 12 diferentes muestras de biodiesel disponibles.

El cálculo de la entalpía de vaporización es importante debido a que permite conocer la cantidad de calor por unidad de masa necesaria para transformar el biodiesel en gas.

### 3.7.15 Determinación del poder calorífico a presión constante

Debido a las condiciones que se dan dentro de la cámara de combustión de los motores, que suelen ser a presión constante y considerando que en la mayoría de las máquinas térmicas los productos quemados se expulsan en fase gaseosa (por lo cual el calor latente asociado a la condensación del vapor de agua de los gases de escape no se aprovecha), se utiliza como valor de referencia energética de los combustibles el poder calorífico inferior a presión constante ( $PCI_p$ ).

El  $PCI_p$  se calculó en base a la reacción de combustión estequiométrica siguiente:



Teniendo en cuenta la reacción anterior, se pudo calcular el  $PCI_p$  del biodiesel como la diferencia de entalpías de formación entre reactivos y productos utilizando la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned}
 PCI_p &= \frac{\Delta H_f^0}{m_f} = \frac{\sum \Delta H_{f \text{ Reactivos}}^0 - \sum \Delta H_{f \text{ Productos}}^0}{m_f} \\
 &= (h_{f_f}^0 - \Delta h_{f_f}^0) + \frac{\left(c + \frac{h}{4} - \frac{o}{2}\right) h_{f_{O_2}}^0}{PM_f} - \frac{(c)h_{f_{CO_2}}^0 + \left(\frac{h}{2}\right) h_{f_{H_2O}}^0}{PM_f}
 \end{aligned}$$

Donde:

$h_{f_f}^0$ : Entalpía de formación estándar del biodiesel.

$h_{f_{O_2}}^0$ : Entalpía de formación estándar del  $O_2$ ,  $h_{f_{O_2}}^0 = 0 \frac{kJ}{kmol}$

$h_{f_{CO_2}}^0$ : Entalpía de formación estándar del  $CO_2$ ,  $h_{f_{CO_2}}^0 = 393510 \frac{kJ}{kmol}$

$h_{f_{H_2O}}^0$ : Entalpía de formación estándar del  $H_2O$ ,  $h_{f_{H_2O}}^0 = 241810 \frac{kJ}{kmol}$

$\Delta h_{f_f}^0$ : Entalpía de vaporización estándar del biodiesel.

### 3.7.16 Determinación del poder calorífico a volumen constante

El calor liberado a volumen constante es la diferencia entre las energías internas de productos y reactivos a temperatura constante, mientras que a presión constante es la diferencia entre las entalpías de productos y reactivos a presión constante como puede observarse en las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned}
 Q_v &= m_f PCI_v = U_f + u_{O_2} m_{O_2} - (u_{CO_2} m_{CO_2} + u_{H_2O} m_{H_2O}) \\
 Q_p &= m_f PCI_p = H_f + h_{O_2} m_{O_2} - (h_{CO_2} m_{CO_2} + h_{H_2O} m_{H_2O})
 \end{aligned}$$



Debido a que las diferencias entre entalpía y energía interna solo son perceptibles en gases debido a su bajo volumen específico, se considera que  $U_f \cong H_f$ , por lo que la ecuación resultante de la resta entre las dos anteriores da como resultado la siguiente ecuación:

$$PCI_p = PCI_v - \frac{m_{O_2}}{m_f}(u_{O_2} - h_{O_2}) + \frac{m_{CO_2}}{m_f}(u_{CO_2} - h_{CO_2}) + \frac{m_{H_2O}}{m_f}(u_{H_2O} - h_{H_2O})$$

Aplicando la definición de entalpía ( $h = u + pv$ ) y la ecuación de estado de los gases ideales ( $pv = \frac{R}{PM}T$ ), de acuerdo con la estequiometría de la reacción de combustión se puede deducir la siguiente ecuación, la que se utilizó para el cálculo del  $PCI_v$  a partir de los valores de  $PCI_p$  y del peso y fórmula molecular del combustible:

$$PCI_v = PCI_p + \left(\frac{h}{4} + \frac{o}{2}\right) \frac{RT}{PM_f}$$

A partir del  $PCI_v$  se dedujo el poder calorífico superior a volumen constante ( $PCS_v$ ) sumando el calor latente de vaporización del agua de los productos, tal como se presenta en la siguiente ecuación:

$$PCS_v = PCI_v + \frac{m_{H_2O}}{m_f} \Delta u_v = PCI_v + \frac{h PM_{H_2O}}{2 PM_f} \Delta u_{vH_2O}^0$$

Donde:

$\Delta u_{vH_2O}^0$ : Energía interna de vaporización estándar del agua,

$$\Delta u_v = 2305 \frac{kJ}{kg}$$

$PM_{H_2O}$ : Peso molecular del agua,  $PM_{H_2O} = 18.0153 \frac{g}{mol}$

Esta medición corresponde al poder calorífico obtenido a través de la utilización de una bomba calorimétrica.

La medición del poder calorífico es un parámetro importante de la calidad del biocombustible debido a que se trata de la cantidad de energía relacionada con la masa que se desprende al producirse la combustión, por lo tanto a mayor calor producido durante el proceso de combustión mejor será el desempeño del motor.

### 3.7.17 Determinación del número de cetano

El índice de Cetano se determinó de manera teórica siguiendo la metodología desarrollada por Lapuerta *et al.* (2009), en dicha metodología se realizó el cálculo considerando la molécula del ácido correspondiente y el tipo de alcohol usado en el proceso de transesterificación a través de la siguiente ecuación:

$$NC = A + (B + C \cdot de + D \cdot de^2)c + E \cdot c^2 \begin{cases} A = -12.157 + 6.130(m - 1) \\ B = 7.965 - 0.324(m - 1) \\ C = -1.785 + 0.263(m - 1) \\ D = 0.235 - 0.107(m - 1) \\ E = -0.099 \end{cases}$$

Donde:

$c$ : Numero de átomos de carbono del ácido.

$de$ : Numero de dobles enlaces del ácido.

$m$ : Numero de carbonos del alcohol empleado en la transesterificación

Debido a que se trata de esteres metílicos, el valor de  $m$  es igual a 1 y considerando la influencia que tiene la presencia del oxígeno en la molécula del ácido, se realizó la sustitución debida en la ecuación anterior lo que dió como resultado la ecuación utilizada para el cálculo del Número de Cetano:

$$NC = -21.157 + (7.965de + 0.235de^2)c - 0.099c^2 - 1.3946(o - 2)$$

El número de cetano es un parámetro importante que mide la calidad de la ignición del combustible, midiendo el tiempo de retraso (tiempo transcurrido entre la inyección del combustible y el comienzo de la combustión), a mayor numero de cetano, menor es el tiempo de retraso.

### 3.7.18 Dosado Estequiométrico

El Dosado Estequiométrico se calculó utilizando como referencia la reacción estequiométrica mencionada anteriormente, de la cual se deduce la siguiente ecuación:

$$F_e = \frac{m_f}{m_a} \Big|_e = \frac{PM_f}{PM_a} \cdot \frac{n_f}{n_a} \Big|_e = \frac{PM_f}{PM_a} \cdot \frac{X_{O_2}}{c + \frac{h}{4} + \frac{o}{2}}$$

Donde:

$PM_a$ : Peso Molecular del aire seco,  $PM_a = 28.9646 \frac{kg}{kmol}$

$X_{O_2}$ : Fracción molar de  $O_2$  en el aire,  $X_{O_2} = 0.2095$

Los valores del Dosado estequiométrico se expresaron en términos del Dosado relativo. Es importante el cálculo del Dosado Estequiométrico debido a que muestra la relación entre biodiesel y aire necesarios para que el proceso de combustión pueda llevarse a cabo.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Colecta de semilla

Se realizó la colecta de semilla de higuera en el estado de Nuevo León (Figura 32) y San Luis Potosí (Figura 33), además, se consiguió semilla de los estados de Chihuahua, Michoacán y del Estado de México.

Las colectas realizadas en el estado de Nuevo León se llevaron a cabo en regiones tanto al sur como al norte del mismo con un total de 17 genotipos de higuera, los cuales pueden observarse en el Cuadro 7.

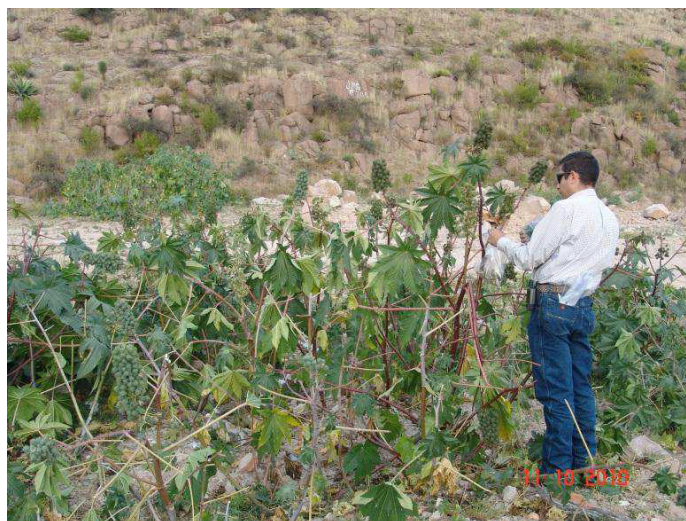
**Cuadro 7. Colectas realizadas en el estado de Nuevo León y su posicionamiento geográfico.**

Identificación	Ubicación Geográfica
C1M1	25.50020°N; 100.19114°W; 517 msnmm
C1M2	25.42388°N; 100.148° W; 462 msnmm
C1M3	25.38129°N; 100.11279°W; 485 msnmm
C1M4	25.25132°N; 99.98088°W; 432 msnmm
C1M5	25.26219°N; 100.00143°W; 438 msnmm
C1M6	25.31533°N; 100.04598°W; 437 msnmm
C1M7	25.36752°N; 100.10281°W; 506 msnmm
C1M8	25.36783°N; 100.10264°W; 508 msnmm
C1M9	25.88634°N; 100.09878°W; 356 msnmm
C2M1	25.87392°N; 100.02563°W; 364 msnmm
C2M2	25.85443°N; 100.02563°W; 387 msnmm
C2M3	25.85517°N; 99.9555°W; 369 msnmm
C2M4	25.86216°N; 99.94144°W; 358 msnmm
C2M5	25.86218°N; 99.94137°W; 375 msnmm
C2M6	25.81242°N; 100.16192°W; 378 msnmm
C2M7	25.95792°N; 100.16258°W; 395 msnmm
C2M8	25.96496°N; 100.1553°W; 428 msnmm



***Figura 32. Colecta realizada en el estado de Nuevo León.***

Del estado de San Luis Potosí se obtuvieron 11 colectas; del estado de Michoacán y el Estado de México, se obtuvo una muestra por entidad, en tanto que del estado de Chihuahua se obtuvieron dos colectas.



***Figura 33. Colecta realizada en el estado de San Luis Potosí.***

## 4.2 Diferenciación Molecular

### 4.2.1 Determinación del protocolo para la caracterización molecular por medio de la técnica de RAPD.

La extracción de ADN realizada a través de la técnica de MasterPure™ Plant Leaf DNA mostró ser una buena técnica debido a las altas concentraciones que se obtuvieron de ADN, principalmente, la muestra EdoMex presento la concentración mayor de ADN extraído, en tanto que la muestra C2M1 presento el valor mínimo, gracias a esta técnica, se obtuvo una concentración de 199.71 ng/μl en promedio, las concentraciones de cada una de las muestras se observan en el Cuadro 8.

**Cuadro 8. Concentración de ADN obtenido utilizando el kit comercial MasterPure™ Plant Leaf DNA**

<b>Colecta</b>	<b>Concentración (ng/μl)</b>
EdoMex	514.0
Chi01	162.2
Chi02	156.7
C2M1	38.0
C1M5	321.4
SLP09	70.0
SLP10	254.5
Mich	81.4

Jasbeer *et al.* (2009) reportaron que la utilización de la técnica de MasterPure™ Plant Leaf DNA dió como resultado la obtención de la mayor

cantidad de ADN en comparación con otros métodos tradicionalmente utilizados.

Además de la alta concentración de ADN, esta técnica de extracción mostró también una calidad aceptable, considerando la relación de las lecturas de absorbancia de 260/280 nm, la cual se observa en el siguiente Cuadro 9.

**Cuadro 9. Relación 260/280 de las diferentes muestras de ADN.**

<b>Muestra</b>	<b>Relación 260/280</b>
EdoMex	1.45
Chi01	1.46
Chi02	1.56
C2M1	1.23
C1M5	1.89
SLP09	1.42
SLP10	1.38
Mich	1.54

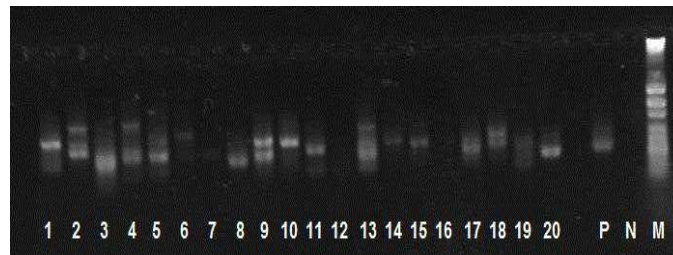
Al respecto, Rada y Taboada (1998) mencionan que la relación entre la medición de absorbancia de 260 y 280 nm es un buen estimador de la calidad del AND extraído, siendo el valor que más se aproxime a 1.8 el que indica el grado máximo de pureza, en tanto que valores menores a 1.8 indican contaminación por proteína y valores mayores a 2.0 indican una contaminación por fenol.

Como se aprecia en el cuadro anterior, las diferentes muestras presentan un grado de contaminación por proteína a excepción de la muestra de la Colecta C1M5, la cual mostro la mayor calidad en esta extracción inicial.



Las pruebas preliminares para determinar los materiales genéticos que producían productos de amplificación de mayor calidad, se realizaron utilizando los iniciadores OPG08, OPG19, OPA04, OPA07 y OPA08 al azar, los cuales indicaron que los genotipos del EdoMéx y Chi01, fueron mejores en términos de las bandas con mayor nitidez y brillo.

El primer gel elaborado para la determinación del protocolo de la técnica RAPDs se realizó con los 20 iniciadores OPA, utilizando el material genético de la colecta del EdoMex; en la Figura 34 las diferentes bandas producidas por los iniciadores OPA combinados con el material genético (la numeración indica los diferentes carriles de carga, donde cada carril corresponde al iniciador, para el carril número uno se utilizó el iniciador OPA01, para el carril dos el OPA02 y así sucesivamente).

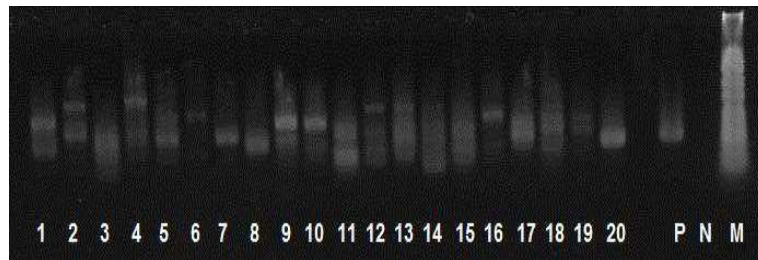


**Figura 34. Gel elaborado con material genético del Estado de México y los 20 distintos iniciadores OPA (1-OPA01, 2-OPA02...20-OPA20), testigo positivo (P), testigo negativo (N) y marcador (M)**

Este primer gel dió como resultado la formación de bandas polimórficas en las diferentes combinaciones. Se aprecian productos de amplificación en los 20 carriles, lo que indica que puede utilizarse esta serie de iniciadores para la caracterización molecular del material, se puede observar que la combinación del iniciador OPA04 presento el producto de amplificación con mayor tamaño, siendo de 633 bp, mientras que el iniciador OPA03 presento el producto de amplificación de menor tamaño con solo 212 bp, en total se produjeron 26

productos de amplificación utilizando la serie OPA en combinación con el material genético procedente del Estado de México.

De la misma manera, en la Figura 35 se muestran las diferentes bandas producidas por la combinación de los iniciadores OPA con el material genético de la muestra procedente del estado de Chihuahua (Chi01).

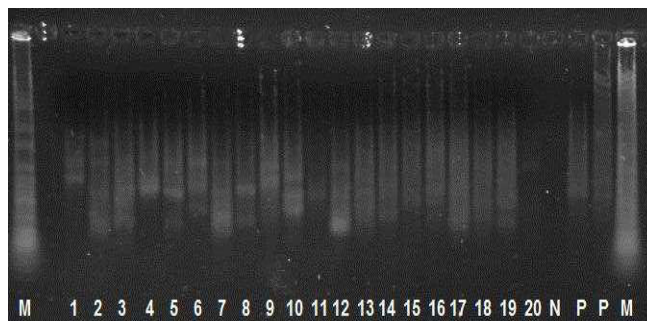


**Figura 35. Gel elaborado con material genético del Estado de Chihuahua y los 20 distintos iniciadores OPA (1-OPA01, 2-OPA02...20-OPA20), testigo positivo (P), testigo negativo (N) y marcador (M)**

En este segundo gel, del mismo modo, se generaron 36 productos de ampliación en los 20 carriles, que indican su uso potencial para la caracterización de este material, puede observarse que el iniciador OPA04 produjo el producto de amplificación de mayor tamaño, presentando este 579 bp, en tanto que el iniciador OPA03 presento el producto de amplificación de menor tamaño (200 bp).

Para el caso del iniciador OPG, los geles se presentaron de manera difusa, y gracias al programa TotalLab se pudo llevar a cabo la identificación de las diferentes bandas presentes en el mismo.

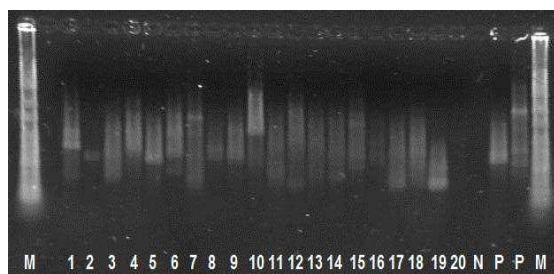
El tercer gel se elaboró con los iniciadores de la serie OPG, combinados con el material genético procedente del Estado de México (EdoMex). En la Figura 36 se observa que se obtuvieron productos de amplificación en todos los carriles.



**Figura 36. Gel elaborado con material genético del Estado de México y los 20 distintos iniciadores OPG (1-OPG01, 2-OPG02...20-OPG20), testigo positivo (P), testigo negativo (N) y marcador (M)**

Se puede observar en el gel anterior, que el iniciador OPG02 presento el producto de amplificación tanto de mayor como de menor tamaño, siendo 589 bp y 182 bp sus valores, respectivamente. Este iniciador en combinación con el material del Estado de México produjo un total de 46 productos de amplificación.

Por último, el gel elaborado con el material genético procedente del estado de Chihuahua (Chi01) dio resultados similares a los anteriores según se observa en la Figura 37.



**Figura 37. Gel elaborado con material genético del Estado de Chihuahua y los 20 distintos iniciadores OPG (1-OPG01, 2-OPG02...20-OPG20), testigo positivo (P), testigo negativo (N) y marcador (M)**

En este gel, se observa que el iniciador OPG20 no mostró productos de amplificación. Asimismo, se puede ver que las muestras produjeron productos de amplificación en los restantes 19 carriles, siendo el iniciador OPG10 el que presentó el producto de amplificación de mayor tamaño (584 bp), en tanto que el iniciador OPG17 presentó el producto de amplificación de menor tamaño (122 bp), esta serie de iniciadores en combinación con el material procedente del Estado de Chihuahua produjo un total de 37 productos de amplificación.

En base a los resultados anteriores podemos pensar que la técnica RAPD es idónea para la caracterización molecular, no solo de *Ricinus communis* sino de cualquier otra especie.

Para evitar los problemas que se presentaron con los iniciadores OPG, se modificó el tiempo de electroforesis, cambiando de una 60 min a 80 volts, a 45 min a 60 volts y cambiando la exposición con la solución de tinción, de 30 min a 45 min en total oscuridad, buscando que al ser más lento el recorrido de los productos de amplificación se obtuviera una mejor separación de las bandas de acuerdo a su peso.

El iniciador OPG mostro ser mejor, debido a su mayor capacidad de generar productos de amplificación siendo en total 83 los generados con los genotipos utilizados, comparado con los 62 productos de amplificación generados por el iniciador OPA. Mientras tanto, no hubo una diferencia amplia entre los genotipos, debido a que el genotipo Chi01 genero 73 productos de amplificación, solo uno más que los generados por el genotipo EdoMex.

Los geles resultantes de las muestras EdoMex y Chi01 presentaron productos de amplificación, tanto con los iniciadores OPA, como los iniciadores OPG, lo cual podría facilitar la diferenciación de material procedente de diversas regiones geográficas, debido a que es probable que sean algunas de estas bandas polimórficas, lo cual indicaría diferencias entre cada uno de los distintos genotipos y los diferentes iniciadores.

#### 4.2.2 Diferenciación genética de las colectas.

Una vez definido el protocolo para la caracterización molecular se procedió a la elaboración de los geles de agarosa con sus respectivos iniciadores, siendo elaborados en bloques de dos iniciadores por cada gel.

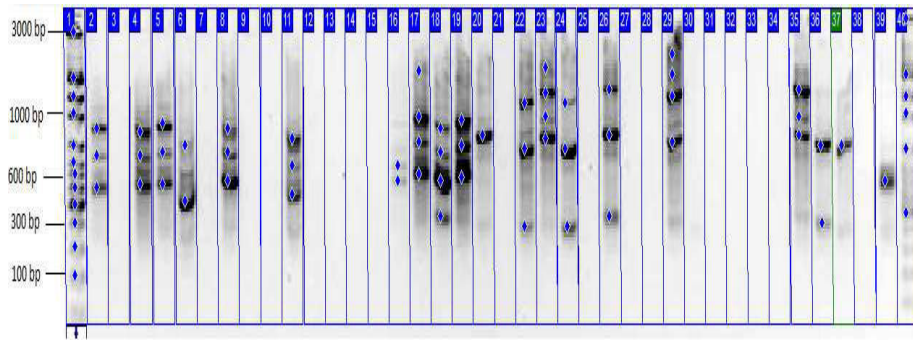
Debido a la gran cantidad de muestras utilizadas en cada gel se decidió numerar los carriles con el fin de facilitar la lectura de cada imagen, la numeración y el contenido de cada carril se muestran en el Cuadro 10.

**Cuadro 10. Numero de carril y contenido de los diferentes geles elaborados para la caracterización molecular.**

<b>Carril</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Carril</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Carril</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Carril</b>	<b>Genotipo</b>
1	Marcador	11	Chi01	21	C1M3	31	SLP02
2	C1M1	12	Chi02	22	C1M6	32	SLP04
3	C1M3	13	SLP02	23	C2M4	33	SLP05
4	C1M6	14	SLP04	24	C2M5	34	SLP06
5	C2M4	15	SLP05	25	C2M6	35	SLP09
6	C2M5	16	SLP06	26	C2M7	36	SLP10
7	C2M6	17	SLP09	27	Mich	37	SLP11
8	C2M7	18	SLP10	28	EdoMex	38	TN
9	Mich	19	SLP11	29	Chi01	39	TP
10	EdoMex	20	C1M1	30	Chi02	40	Marcador

##### 4.2.2.1 Iniciador OPA

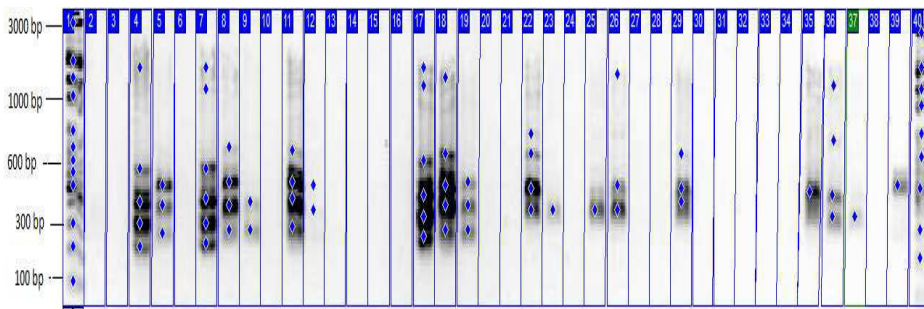
El primer gel elaborado para la diferenciación molecular estuvo conformado por los 18 genotipos y los iniciadores OPA01 y OPA02; en la Figura 38 se observa los productos de amplificación y las bandas polimórficas.



**Figura 38. Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPA01 (Carriles 2-19) y OPA02 (Carriles 20-37).**

En la figura anterior se observa que los iniciadores OPA01 y OPA02 amplificaron bandas polimórficas; para el caso del iniciador OPA01 se amplificaron un total de 30 productos, de los cuales se consideraron 22 como marcadores moleculares debido a la definición de sus bandas y a su intensidad, por otro lado, para el caso del iniciador OPA02 se generaron un total de 24 productos de amplificación, de los cuales solo 16 fueron considerados como marcadores moleculares, el total de productos y el peso molecular de los marcadores se muestran en el Anexo 2.

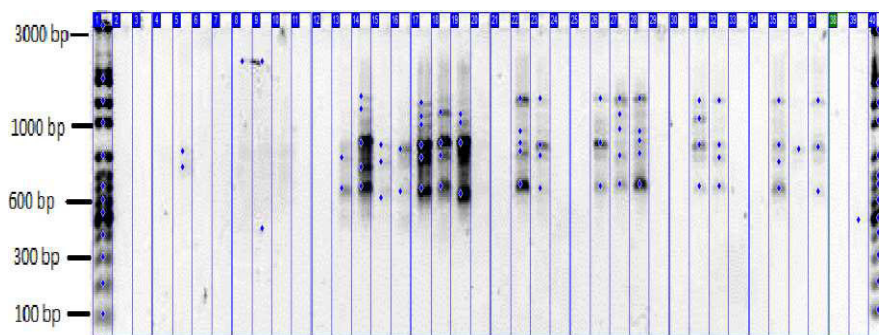
En la figura 39 se observa el gel elaborado con los iniciadores OPA03 y OPA04 y sus respectivos productos de amplificación.



**Figura 39. Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPA03 (Carriles 2-19) y OPA04 (Carriles 20-37).**

En la figura anterior se observa que ambos iniciadores amplificaron bandas polimórficas. El iniciador OPA03 genero un total de 40 productos de amplificación, de los cuales 25 fueron considerados como marcadores, en tanto que el iniciador OPA04 amplifico un total de 18 productos, siendo considerados como marcadores solamente 11, el total de productos y los pesos moleculares se presentan en el Anexo 3.

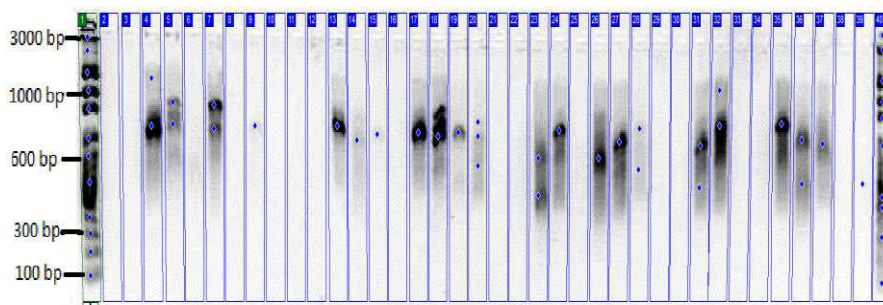
En la Figura 40 se presenta el gel elaborado con los iniciadores OPA05 y OPA06.



**Figura 40. Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los Iniciadores OPA05 (Carriles 2-19) y OPA06 (Carriles 20-37).**

En la figura anterior se aprecia ambos iniciadores amplificaron bandas polimórficas. Además, se puede observar que el iniciador OPA05 amplificó un total de 31 productos, siendo solo 14 los que fueron considerados como marcadores, debido a sus características, en tanto que el iniciador OPA06 amplifico un total de 38 productos, de los cuales 11 fueron considerados como marcadores, en el Anexo 4 se muestran el total de productos amplificados y sus respectivos pesos moleculares.

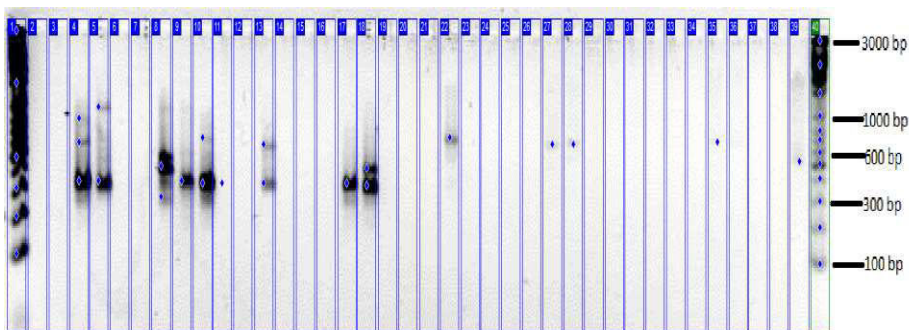
En la Figura 41 se observa el gel elaborado con los iniciadores OPA07 y OPA08.



**Figura 41. Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPA07 (Carriles 2-19) y OPA08 (Carriles 20-37).**

En la figura anterior se aprecia que ambos iniciadores amplificaron solo bandas polimórficas. A pesar de presentarse el gel barrido, el programa TotalLab permitió observar que el iniciador OPA07 amplificó un total de 13 productos de los cuales nueve fueron considerados como marcadores, por otro lado el iniciador OPA08 amplificó un total de 18 productos, de los cuales 10 fueron considerados como marcadores, el total de productos de amplificación, marcadores y sus respectivos pesos moleculares se pueden observar en el Anexo 5.

En el caso de los iniciadores OPA09 y OPA10 el gel respectivo se presenta en la Figura 42.

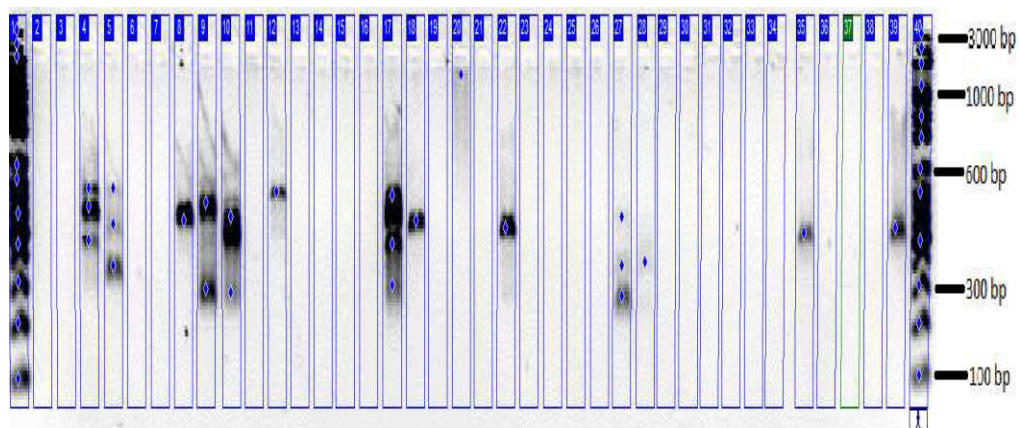


**Figura 42. Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPA09 (Carriles 2-19) y OPA10 (Carriles 20-37).**



En la figura anterior se aprecia ambos marcadores amplificaron bandas polimórficas. Además, se observa que el iniciador OPA09 amplifico un total de 15 productos de los cuales nueve fueron considerados como marcadores, en tanto que el iniciador OPA10 amplifico un total de cuatro productos, de los cuales, debido a que no se percibían de manera nítida, en base al nivel de pixeles que presentaron, no fue considerado ninguno como marcador. En el Anexo 6, se muestran el total de productos amplificados y aquellos que fueron considerados marcadores y sus respectivos pesos moleculares.

Para los iniciadores OPA11 y OPA12 se observa el gel producido en la Figura 43.

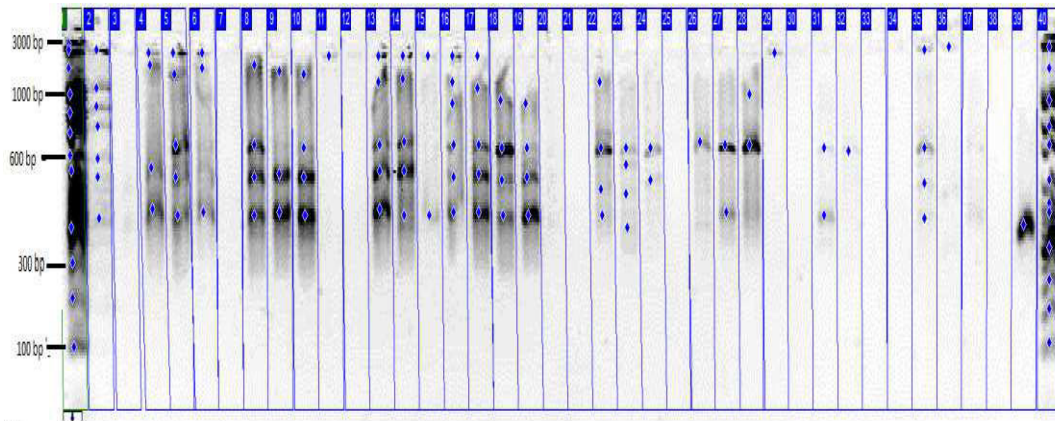


**Figura 43. Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPA11 (Carriles 2-19) y OPA12 (Carriles 20-37).**

Se puede observar en la figura anterior que ambos iniciadores produjeron bandas polimórficas. El iniciador OPA11 genero un total de 16 productos, de los cuales 12 fueron considerados como marcadores, en tanto que el iniciador OPA12 amplifico siete productos de amplificación, de los cuales solamente dos fueron considerados como marcadores.

En el Anexo 7 se pueden observar a detalle el total de productos de amplificación, marcadores y sus respectivos pesos moleculares.

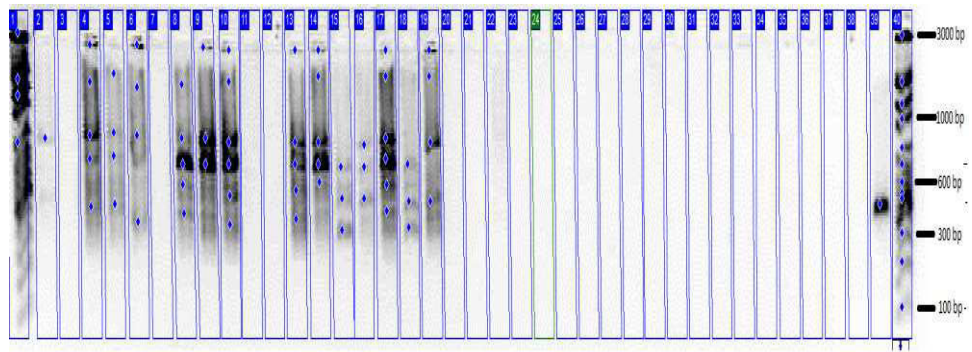
El gel elaborado con los Iniciadores OPA13 y OPA 14 se aprecia en la Figura 44.



**Figura 44. Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los Iniciadores OPA13 (Carriles 2-19) y OPA14 (Carriles 20-37).**

En la figura anterior se aprecia que ambos iniciadores produjeron bandas polimórficas. El iniciador OPA 13 generó un total de 62 productos, de los cuales 23 fueron considerados como marcadores, mientras que el iniciador OPA 14 produjo un total de 24 productos, de los cuales solamente tres fueron considerados como marcadores; en el Anexo 8 se presentan el total de productos y sus respectivos pesos moleculares.

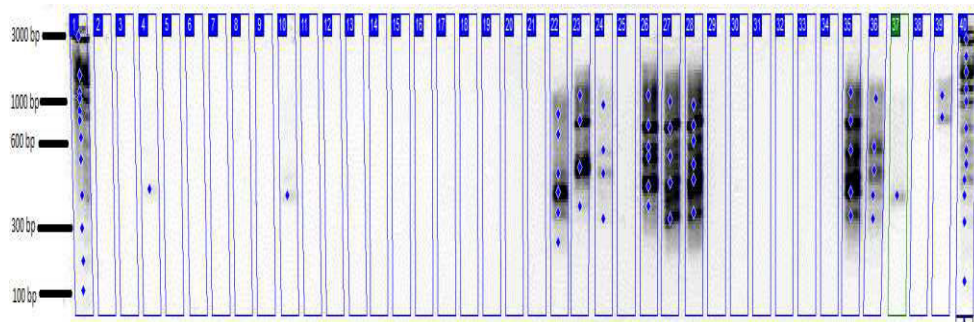
En la Figura 45 se aprecia el gel elaborado con los iniciadores OPA15 y OPA16.



**Figura 45. Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPA15 (Carriles 2-19) y OPA16 (Carriles 20-37).**

En la figura anterior se observa que los dos iniciadores presentaron bandas polimórficas. También se aprecia en la figura anterior que el iniciador OPA15 amplificó un total de 57 productos, de los cuales solamente 13 fueron considerados como marcadores, en tanto que el iniciador OPA16 no produjo ningún producto de amplificación, el total de productos y sus respectivos pesos moleculares se presentan en el Anexo 9.

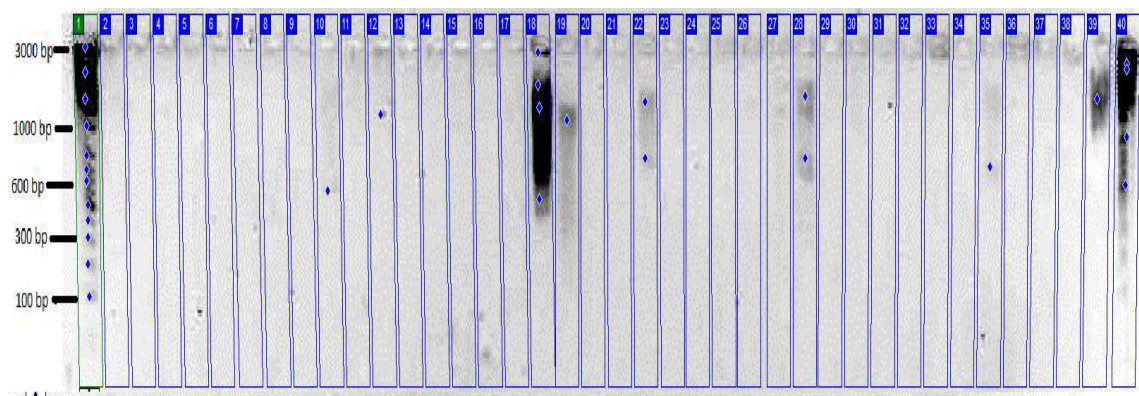
En la Figura 46 se aprecia el gel y los productos de amplificación obtenidos utilizando los iniciadores OPA17 y OPA18.



**Figura 46. Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPA17 (Carriles 2-19) y OPA18 (Carriles 20-37).**

En la figura anterior se observa que los dos iniciadores presentaron bandas polimórficas sin embargo, debido a la baja calidad de los dos productos de amplificación generados por el iniciador OPA17, estos no fueron considerados como marcadores, mientras que de los 42 productos generados por el iniciador OPA18, 20 fueron considerados como marcadores; el total de productos y sus respectivos pesos moleculares se pueden observar en el Anexo 10.

En la Figura 47 se observa el gel elaborado con los iniciadores OPA19 y OPA20.



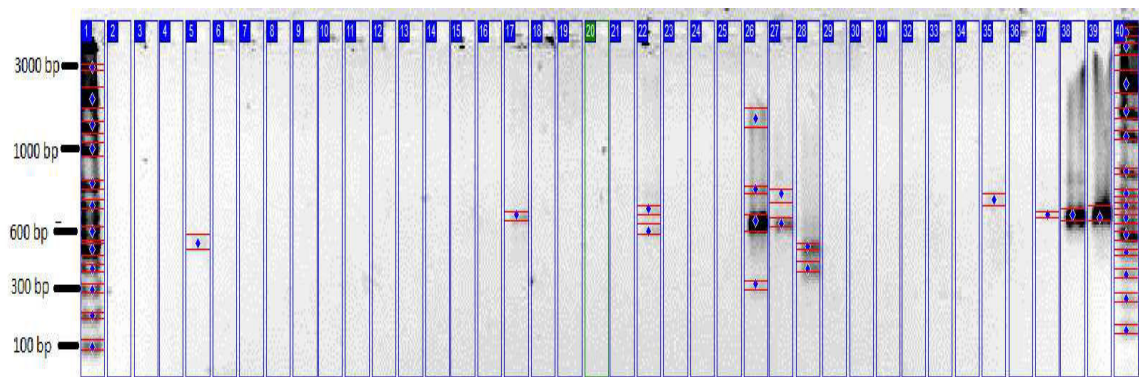
**Figura 47. Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los Iniciadores OPA19 (Carriles 2-19) y OPA20 (Carriles 20-37).**

En la figura anterior se observa que los dos iniciadores presentaron bandas polimórficas. Además, se observa también que el iniciador OPA19 amplificó solamente siete productos, de los cuales solo dos fueron considerados como marcadores, en tanto que el iniciador OPA20 solo generó cinco productos de amplificación de los cuales ninguno pudo ser considerado como marcador, en el Anexo 11 se muestran el total de productos de amplificación y sus respectivos pesos moleculares.

Además, se elaboró una matriz binaria en base a los datos anteriores, siendo la ausencia de marcadores “0” y la presencia “1”, con el fin de obtener el Índice de Diversidad, el cual, para el caso de la serie OPA fue de 0.871.

#### 4.2.2.2 Iniciador OPG

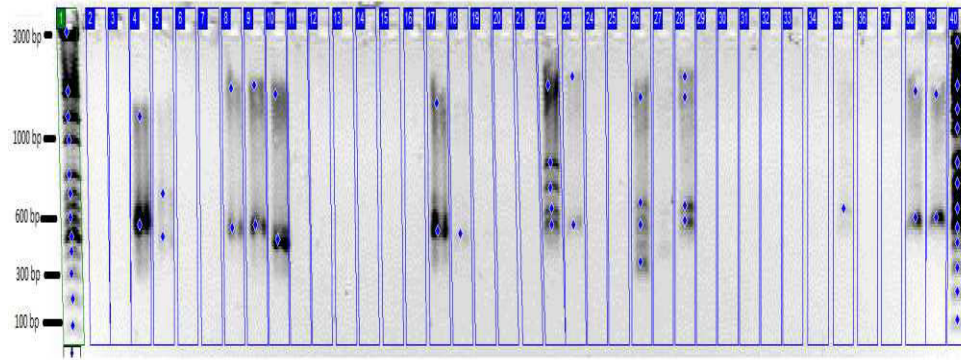
Para el iniciador OPG el primer gel que se muestra en la Figura 48 se elaboró con los iniciadores OPG01 y OPG02.



**Figura 48. Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPG01 (Carriles 2-19) y OPG 02 (Carriles 20-37).**

En la figura anterior se observa que los dos iniciadores presentaron bandas polimórficas. Además, cabe destacar que el iniciador OPG01 amplificó un total de dos productos, de los cuales ninguno fue considerado como marcador, debido al bajo nivel de brillo y poca definición que presentaron, sin embargo, el iniciador OPG02 amplificó un total de 12 productos de los cuales se consideraron como marcadores cuatro de ellos, el total de productos y sus respectivos pesos moleculares se observan en el Anexo 12.

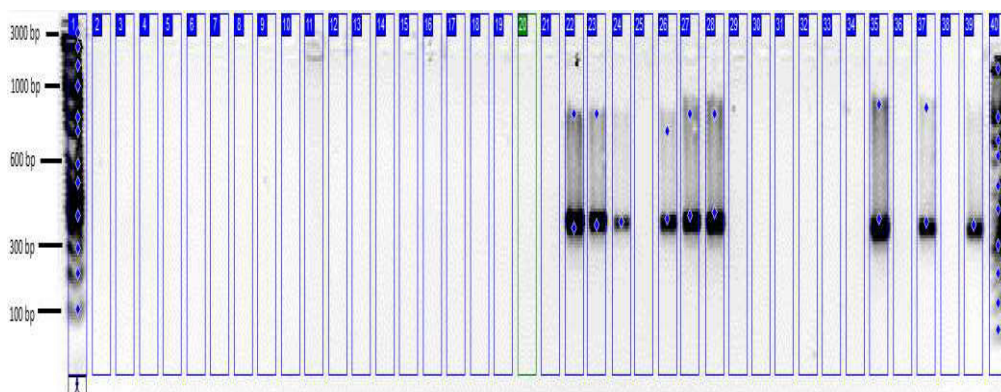
El gel elaborado con los Iniciadores OPG03 y OPG04 se muestra en la Figura 49.



**Figura. 49** Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPG03 (Carriles 2-19) y OPG04 (Carriles 20-37).

En la figura anterior se observa que ambos iniciadores amplificaron bandas polimórficas, por un lado el iniciador OPG03 amplifico un total de 13 productos de los cuales cinco fueron considerados como marcadores, en tanto que el iniciador OPG04 amplifico un total de 16 productos, de los cuales cinco fueron considerados como marcadores, el total de productos y sus respectivos pesos moleculares se observan en el Anexo 13.

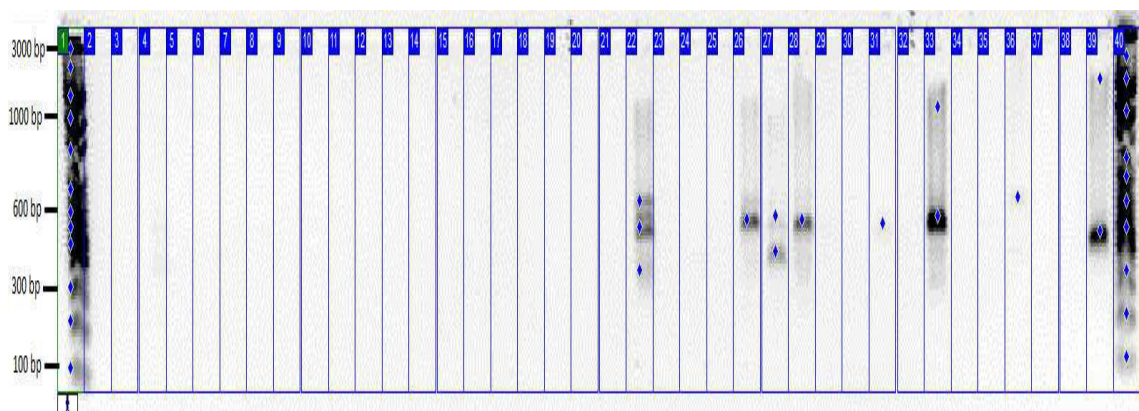
El gel elaborado con los Iniciadores OPG05 y OPG06 se muestra en la Figura 50.



**Figura 50.** Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los Iniciadores OPG05 (Carriles 2-19) y OPG06 (Carriles 20-37).

En la figura anterior se observa que el iniciador OPG05 no presento ningún producto de amplificación, mientras que para el caso del iniciador OPG06 presento bandas polimórficas, en total este iniciador amplifico 15 productos de los cuales 8 fueron considerados como marcadores. El total de productos amplificados en este gel y sus respectivos pesos moleculares se observan en el Anexo 14.

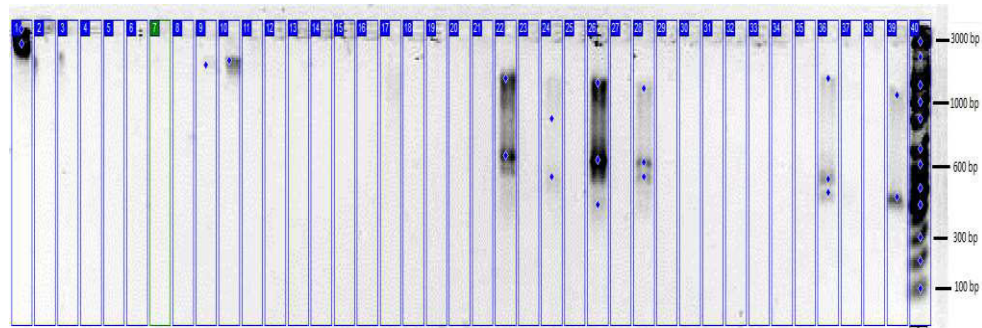
El gel elaborado con los Iniciadores OPG07 y OPG08 se muestra en la figura siguiente (Figura 51).



**Figura 51. Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los Iniciadores OPG07 (Carriles 2-19) y OPG08 (Carriles 20-37).**

En la figura anterior se observa que el iniciador OPG07 no presento ningún producto de amplificación, mientras que para el iniciador OPG08 presento bandas polimórficas. Se observa también que este iniciador amplifico un total de 11 productos de los cuales cuatro fueron considerados como marcadores, finalmente el total de productos y sus respectivos pesos moleculares se observan en el Anexo 15.

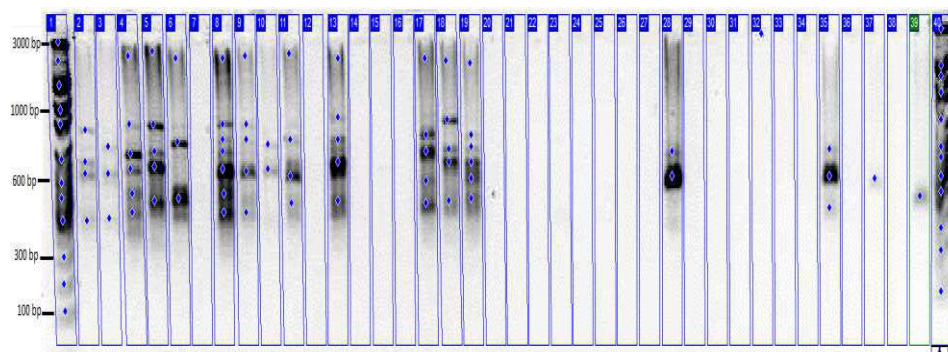
El gel elaborado con los iniciadores OPG09 y OPG10 se muestra en la Figura 52.



**Figura 52. Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPG09 (Carriles 2-19) y OPG10 (Carriles 20-37).**

Se puede observar en la figura anterior que los iniciadores OPG09 y OPG10 amplificaron un total de dos y 13 productos respectivamente, siendo considerados como marcadores solo uno en el caso del iniciador OPG09 y ocho del iniciador OPG10, el total de productos de amplificación y sus respectivos pesos moleculares se observan en el Anexo 16.

El gel elaborado con los iniciadores OPG11 y OPG12 se muestra en la Figura 53.

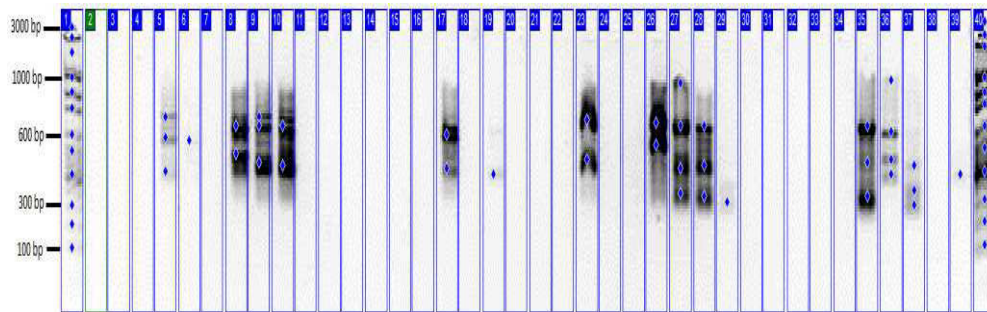


**Figura 53. Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPG11 (Carriles 2-19) y OPG12 (Carriles 20-37).**



En la figura anterior se observa que los dos iniciadores presentaron bandas polimórficas, para el caso del iniciador OPG11 se presentaron un total de 60 productos amplificados de los cuales solo 16 tenían la calidad suficiente en cuanto a brillo y definición para ser considerados como marcadores, en tanto que para el caso del iniciador OPG12 se encontraron un total de siete productos de amplificación, de los cuales solo dos fueron considerados como marcadores, el total de productos amplificados y sus respectivos pesos moleculares se observan en el Anexo 17.

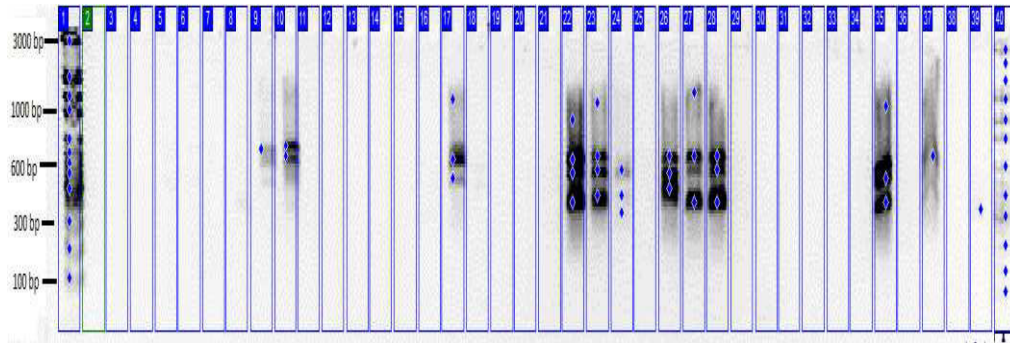
El gel de los iniciadores OPG13 y OPG14 se muestra en la Figura 54.



**Figura 54. Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPG13 (Carriles 2-19) y OPG14 (Carriles 20-37).**

Ambos iniciadores presentaron bandas polimórficas, como se puede observar en la figura anterior, el iniciador OPG13 genero un total de 14 productos de amplificación, de los cuales, la mitad fueron considerados como marcadores, mientras que el iniciador OPG14 genero un total de 22 productos, siendo considerados como marcadores solo 13 de estos, el total de productos y sus respectivos pesos se observan en el Anexo 18.

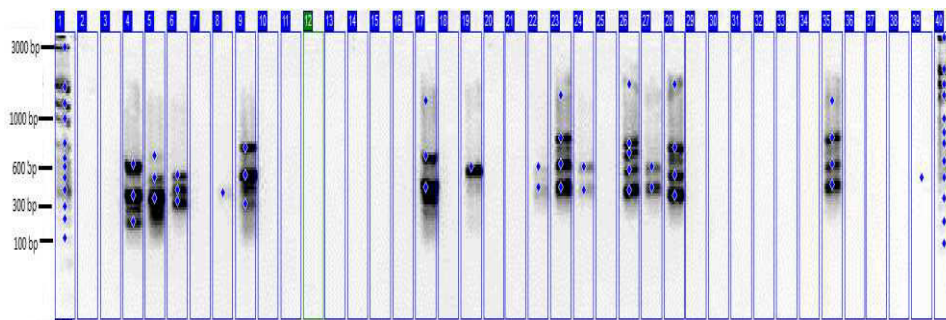
El gel elaborado con los iniciadores OPG15 y OPG16 se muestra en la Figura 55.



**Figura 55. Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPG15 (Carriles 2-19) y OPG16 (Carriles 20-37).**

En la figura anterior se observa que los dos iniciadores presentaron bandas polimórficas, el iniciador OPG15 generó un total de seis productos de amplificación, de los cuales tres fueron considerados como marcadores, en tanto que el iniciador OPG16 amplificó un total de 24 productos, de los cuales 16 fueron considerados como marcadores, el total de productos amplificados y sus pesos. Además, se determinó la cantidad de marcadores moleculares y los pesos de todos los productos de amplificación los cuales se observan en el Anexo 19.

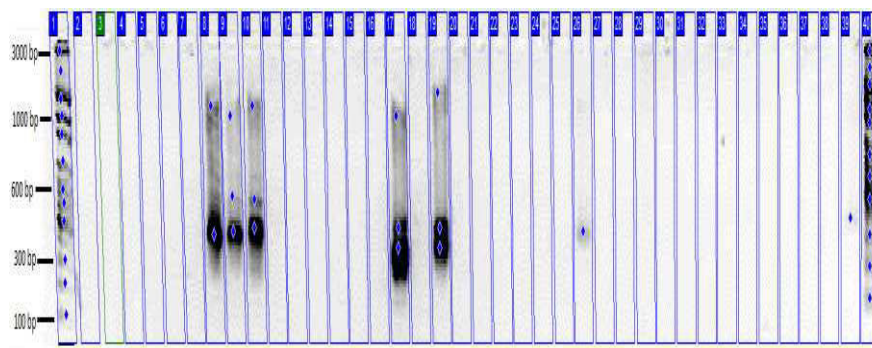
La Figura 56 muestra el gel elaborado con los iniciadores OPG17 y OPG18.



**Figura 56. Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPG17 (Carriles 2-19) y OPG18 (Carriles 20-37).**

En la figura anterior se observa que los dos iniciadores presentaron bandas polimórficas. Además, se observa por parte del iniciador OPG17 la generación de 17 productos de amplificación, de los cuales 13 fueron considerados como marcadores, mientras que el iniciador OPG18 amplificó un total de 23 productos, de los cuales 14 se consideraron como marcadores, en el Anexo 20 se pueden observar el total de productos amplificados y sus pesos moleculares.

El gel elaborado con los Iniciadores OPG19 y OPG20 se muestra en la Figura 57.



**Figura 57. Gel elaborado con los 18 genotipos diferentes y los iniciadores OPG 19 (Carriles 2-19) y OPG20 (Carriles 20-37).**

Finalmente se puede observar en la figura anterior que el iniciador OPG19 presentó bandas polimórficas, amplificando un total de 14 productos de los cuales cinco fueron considerados como marcadores moleculares, mientras que el iniciador OPG20 solo amplificó un producto el cual no fue considerado como marcador; en el Anexo 21 se observan el total de productos amplificados y sus respectivos pesos moleculares.

En total, considerando el iniciador OPG y los 18 diferentes genotipos se produjeron 272 productos de amplificación de los cuales 124 (45.58%) fueron considerados como marcadores y 93 (54.42%) fueron descartados por su baja

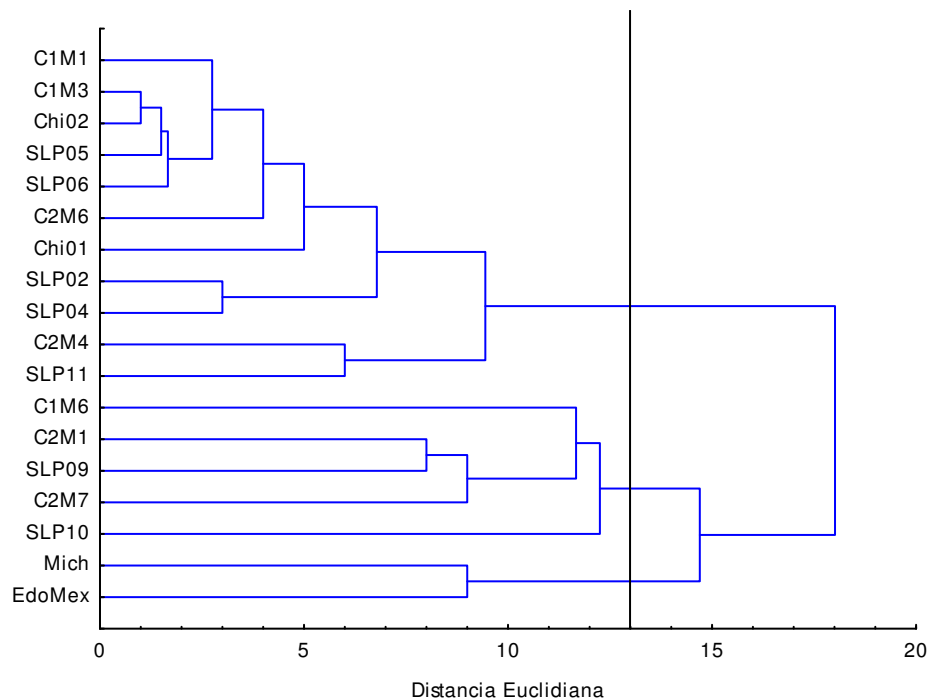
calidad; además, el índice de diversidad encontrado en la población estudiada con este iniciador fue de 0.935.

Finalmente, considerando los datos obtenidos con ambos iniciadores, se obtuvieron en total 725 productos de amplificación, de los cuales 326 (44.96%) fueron productos de amplificación aptos para ser considerados como marcadores y 249 (55.04%) que presentaron una baja calidad, por lo cual no fueron considerados como marcadores, además de promediar un índice de diversidad de 0.903, siendo este valor un indicador de la alta variabilidad genética de la población. Considerando la información anterior, la higuera (*Ricinus communis* L.) esta alta variabilidad genética implica una investigación más detallada de las características específicas de los diversos materiales disponibles, sobre todo con miras a la implementación de un sistema de producción intensivo de semilla.

En un estudio comparativo, Gajera *et al.* (2010) mencionaron que la técnica de RAPDs utilizando 22 genotipos e iniciadores diferentes produjeron 256 fragmentos, de los cuales 205 (80.2%) se trataba de fragmentos polimórficos, lo cual indicó que la técnica es una buena herramienta para la valoración de la diversidad genética.

#### **4.2.2.3 Análisis de clúster y clasificación en base a los resultados de la técnica de RAPD.**

Una vez obtenidos los datos anteriores, se procedió a la elaboración de una matriz binaria (19x20), en la cual la presencia de marcadores adquirió el valor de uno y la ausencia de las mismas el valor de 0. Ya elaborada la matriz, se realizó el análisis en clúster utilizando el método de U.P.G.M.A. con la finalidad de agrupar los diferentes genotipos encontrados en grupos similares. Dicho análisis se llevó a cabo utilizando el Programa computacional Statistica 7.0. Del anterior análisis como resultado se obtuvo el dendrograma de la Figura 58.



**Figura 58. Dendrograma del análisis en clúster de los 18 genotipos de higuera utilizados.**

En la figura anterior se observa la clara formación de tres grupos principales, el primero de ellos se integra por las colectas C1M1, C1M3, Chi02, SLP05, SLP06, C2M6, Chi01, SLP02, SLP04, C2M4 y SLP11, mientras que el segundo grupo se encuentra conformado por las colectas C1M6, C2M1, SLP09, C2M7, SLP10, finalmente, el tercer grupo se conformo por las colectas Mich y EdoMex.

Con base en los resultados del análisis molecular y considerando las características morfológicas de las diferentes colectas (las cuales se presentan más adelante) se pudo observar que la agrupación que se muestra en este análisis se relaciona directamente con algunos parámetros productivos, en relación a la altura de la planta a la primera floración.

El primer grupo presento un promedio de 36 cm, en tanto que el segundo grupo promedio 58.8 cm y el tercer grupo mostro una altura de 102 cm, además también se presentan diferencias en relación al número de hojas, el primer

grupo promedio un total de 17.5 hojas a la primera floración, mientras que el segundo presento un promedio de 25.8 hojas y el tercer grupo mostro un promedio de 14 hojas, para la variable largo y ancho de semilla los grupos uno y dos presentaron promedios similares (siendo el promedio del largo entre .95 cm y .91 cm, mientras que el ancho promedio fue de 0.62 cm y 0.60 cm respectivamente) en tanto que el grupo tres presenta semillas más grandes, las cuales promedian 1.34 cm de largo y 0.73 cm de ancho, otra característica importante es el numero de frutos por inflorescencia, el grupo uno presento en promedio 136.59 frutos, mientras que el grupo dos promedio 92.1 frutos por inflorescencia y el grupo tres solo promedio 47.5 frutos

El primer grupo, se trata de plantas de higuierilla de porte más bajo, con una cantidad media de hojas y con inflorescencias largas comparado con los otros dos subgrupos, es importante mencionar que este grupo se formo a una distancia de eslabonamiento de nueve unidades euclidianas.

El segundo grupo, se trata de plantas de porte medio, con una gran cantidad de hojas y una cantidad media de frutos por inflorescencia, cabe destacar que este grupo se formo a una distancia de 12.5 unidades euclidianas.

Cabe destacar que el análisis molecular agrupo a una distancia de nueve unidades euclidianas las dos colectas procedentes de climas templados (Mich y EdoMex), las cuales conforman el grupo III, lo cual indica que estas pudieran ser genéticamente muy similares y que ambas al provenir de climas más frescos y húmedos presentaran una respuesta adaptativa similar. Este grupo se encuentra conformado por las colectas que promediaron una mayor altura a la floración, un menor promedio de hojas, además de que las semillas de este grupo fueron en promedio más grandes, tanto en ancho como en largo, aunque se trata de colectas que presentaron un promedio bajo en relación al largo de la inflorescencia, lo cual es un aspecto negativo para la producción de semilla.

Gajera *et al.* (2010) reportaron que la utilización de la técnica de RAPD en su investigación también se formaron dos grupos al analizar 22 genotipos; aunque

indicaron, que los 22 genotipos presentaron un alto nivel de polimorfismo (más del 60%), razón por la cual no se pudo obtener una clasificación adecuada.

Respecto al alto nivel de polimorfismo presente en la investigación de Gajera *et al.* (2010), Williams *et al.* (1990) mencionaron que en algunas ocasiones, la técnica de RAPDs detecta cambios en bases sencillas del genoma de la higuera, lo cual provoca un cambio completo en el patrón de amplificación de los segmentos de ADN.

### 4.3 Caracterización morfológica.

#### 4.3.1 Variables climatológicas presentes durante el ensayo.

Durante la etapa de la caracterización morfológica se llevo a cabo el monitoreo de las variables climatológicas que se presentaron durante el desarrollo de la fase experimental, las cuales se presentan en el Cuadro 11.

**Cuadro 11. Variables climáticas reportadas en Marín, N.L. durante el periodo de Abril-Diciembre del año 2011.**

Mes	Precipitación (mm)	T. Max. (°C)	T. Min. (°C)	T. Med. (°C)	HR (%)	Radiación (w/m <sup>2</sup> )	Evap. (mm)
Abril	0	36.7	18.6	27.5	46.4	551.2	181.7
Mayo	16	36.1	22.03	28.3	54.7	478.1	171.4
Junio	0	37.3	22.6	29.7	50.2	293.9	104.7
Julio	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Agosto	0.6	35.1	26.3	29.1	58.2	8.11	1
Septiembre	92	36.8	20.2	28.4	51.3	548.8	162
Octubre	110.2	30.03	16.1	22.8	60.5	503.5	127.7
Noviembre	1.6	27.9	10.7	19.4	51.8	464.1	110.4
Diciembre	70	21.1	7.7	13.7	70.7	317.6	22.1
TOTAL	290.4	-----	-----	-----	-----	-----	881
PROMEDIO	-----	30.9	15.6	22.9	56.4	376.3	-----

Se puede observar en el cuadro anterior, que la precipitación total durante el periodo de la evaluación morfológica fue de 290.4 mm y 881 mm de evapotranspiración total, en tanto que la temperatura máxima registrada fue de 37.38°C, además de presentar un promedio de 56.47 mm de humedad relativa, 376.9 w/m<sup>2</sup> de radiación promedio.

#### **4.3.2 Determinación del periodo de latencia, dinámica de germinación y porcentaje de plantas germinadas.**

Los datos obtenidos durante la evaluación del material que se muestran en el Anexo 22, permitieron la estimación de las siguientes variables.

##### **4.3.2.1 Periodo de germinación.**

El periodo de germinación que presentaron las diferentes colectas vario de 10 a 41 días, siendo la colecta C2M1 la más precoz de todas (10 días) mientras que las colectas C2M4 y SLP04 las más tardías (41 días); además, la colecta C2M7 no desarrolló plántulas durante el periodo de la prueba. Se observó que todas las variedades presentaron hojas primarias (Figura 59), las cuales fueron eliminadas por la misma planta a los 8 días para dar lugar a las hojas definitivas. El total de días de germinación puede observarse en el Cuadro 12.

***Cuadro 12. Periodo de Germinación de las diferentes colectas de Higuierilla.***

Colecta	Periodo de Germinación (días)	Colecta	Periodo de Germinación (días)
C1M9	28	EdoMex	28
C2M1	10	Mich	20
C2M2	28	SLP02	15

**Continúa...**



**Cuadro 11. Continuación.**

C2M3	34	SLP03	34
C2M4	41	SLP04	41
C2M5	25	SLP05	33
C2M6	28	SLP06	28
C2M7	-----	SLP08	34
C2M8	34	SLP09	20
Chi01	20	SLP10	26
Chi02	20	SLP11	28



***Figura 59. Hojas primarias de la higuerilla***

El amplio periodo de latencia que presentaron la mayoría de las colectas de higuerilla pudo ser ocasionado tanto por factores internos como externos, dentro de los factores internos que posiblemente afectaron el porcentaje de emergencia pudo ser el desarrollo de la semilla o la madurez de la misma, debido a que al momento de ser colectadas no todas las semillas se encontraban en el mismo estado de desarrollo, mientras que algunos factores externos que pueden afectar el periodo de latencia son la temperatura ambiental y la humedad del sustrato.

Koutroubas *et al.* (1999) reportaron que existen efectos de la temperatura del suelo en el periodo de latencia, siendo menor este periodo cuando se presentaron mayores temperaturas de suelo al momento de la siembra. Soares y de Souza (2005) mencionaron que el periodo de latencia de la semilla en climas fríos (por debajo de 20°C) es superior a los 15 días e inferior a los 20 días.

#### 4.3.2.2 Dinámica de Emergencia.

Los resultados obtenidos de la dinámica de emergencia se observaron en la Figura 60.

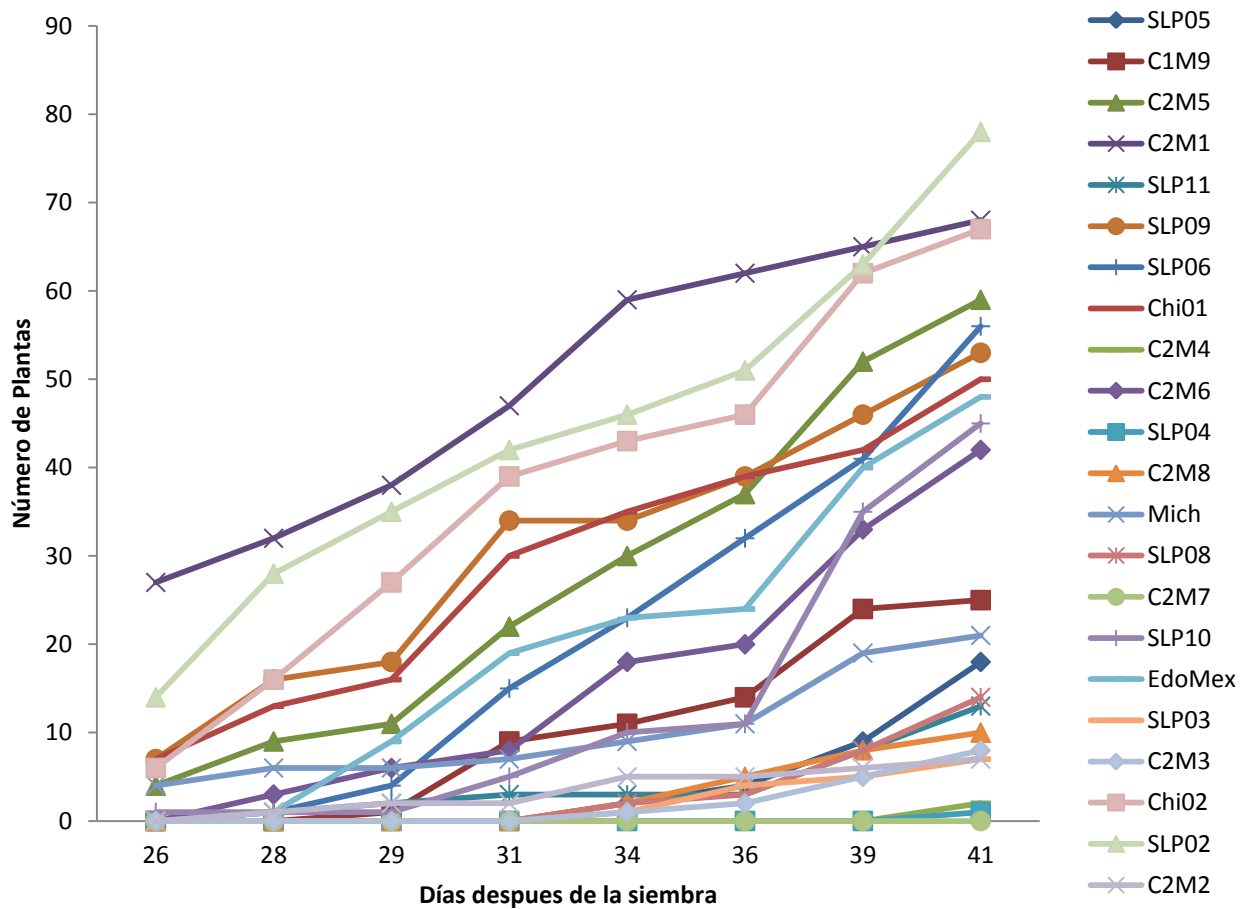
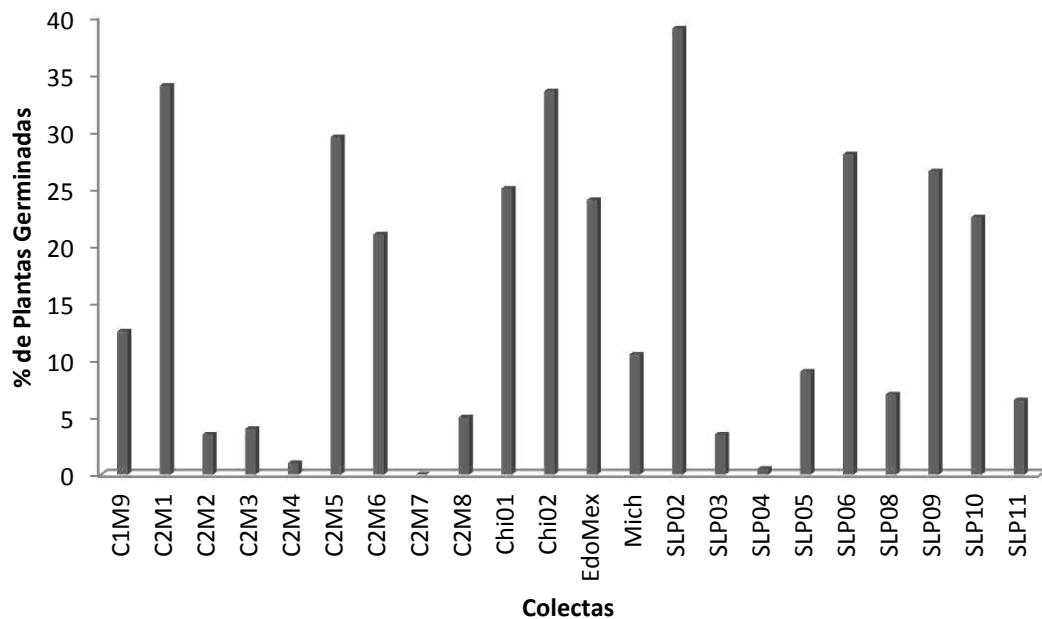


Figura 60. Dinámica de Emergencia de las diferentes colectas de Higuerrilla.

En la figura anterior destaca las diferencias en la velocidad a la que las diferentes colectas emergen. A pesar de las diferencias en relación al período de latencia, se observa una tendencia similar en la dinámica de la germinación. Como se puede observar, la mayoría de las Colectas presento una baja dinámica, siendo muy prolongado el periodo necesario para la germinación de las plantas, solamente las Colectas SLP02, Chi02 y C2M1 presentaron una buena dinámica, comparada con el resto de colectas, alcanzando más del 60% de plantas germinadas.

### 4.3.2.3 Porciento de Plantas Germinadas.

El Porcentaje de Plantas Germinadas se muestra en la Figura 61.



**Figura 61. Porcentaje de plantas germinadas.**

En la figura anterior se observa que la colecta con el mayor porcentaje de semillas germinadas fue la colecta SLP02, seguida por la colecta Chi02 y la colecta C2M1.

Al parecer, no hay correlación entre el origen de los genotipos y el porcentaje de semillas germinadas, debido a que las colectas, tanto del estado de Nuevo León como de San Luis Potosí presentaron porcentajes muy contrastantes que oscilaron entre el 0% y el 33.5%. Para el caso de los genotipos procedentes del estado de Chihuahua, presentaron un porcentaje de germinación de 25% (Chi01) y 33.5% (Chi02), mientras que la colecta procedente del Estado de México presentó un 24% de emergencia y el porcentaje de germinación de la colecta del estado de Michoacán fue de 10.5%.

Leal y Jiménez (2009) reportaron % de germinación que oscilan entre el 66 y 91%, colocando dos semillas en cada sitio de siembra, además de haber realizado la siembra en campo, comparados con los datos obtenidos, el porcentaje de germinación de las colectas en general es menor, debido a que en el caso de la investigación antes mencionada, se trabajó con materiales híbridos, en tanto que las diversas colectas analizadas en este trabajo son materiales silvestres, a pesar de lo anterior, considerando dos semillas por sitio de siembra, las colectas C2M1 (68%), Chi02 (67%) y SLP02 (78%) presentan valores de germinación muy similares a los reportados con materiales híbridos.

#### **4.3.3 Días a Floración.**

El análisis de varianza para esta variable indicó que existen diferencias altamente significativas entre genotipos para Días a inicio de Floración (Cuadro 13).

**Cuadro 13. Análisis de varianza y C.V. de la variable días a inicio de floración**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>GL</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>F<sub>cal.</sub></b>	<b>Sig.*</b>
Colecta	16	8056.765	503.548	299.705	**
Bloque	1	0.118	0.118	0.07	NS
Error	16	26.882	1.68		
Total	33	207826			

Sig.\*=Significancia C.V.(%)=20.4

Debido a que se mostraron diferencias altamente significativas para la variable analizada, se realizó la comparación de medias, la cual mostró nueve grupos como puede observarse en el Cuadro 14.

**Cuadro 14. Prueba de Tukey para la comparación de medias de la variable días a inicio de floración**

<b>Colecta</b>	<b>Promedio</b>	<b>Subconjunto</b>								
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
Chi02	57.5	a								
Chi01	58.0	a								
C2M6	61.0	a								
SLP04	62.5	a	b							
SLP10	66.5		b	c						
C2M7	70.5			c	d					
SLP06	70.5			c	d					
SLP03	71.0			c	d					
C1M3	71.5			c	d					
C1M6	75.0				d	e				
SLP05	78.5					e	f			
SLP11	81.0						f	g		
SLP02	83.0						f	g		
C2M1	84.0							g		
C2M4	91.5								h	
C1M1	110.5									i
EdoMex	110.5									i

Las 17 diferentes colectas mostraron comportamientos muy variados con relación a los días a la primera floración, variando desde 57 días los más precoces hasta 110 días a floración los valores máximos.

Dentro de la comparación de medias, el primer grupo (Cuadro 13) incluye cuatro genotipos precoces, siendo destacables los genotipos procedentes del estado de Chihuahua los que presentan un promedio de 57 días al inicio de la floración, en tanto que los tres genotipos pertenecientes al grupo de los más tardíos fueron procedentes del estado de Nuevo León (C1M1) y Estado de México (EdoMex), los cuales presentaron un promedio de 110.5 días.

Joshi *et al.* (2002) reportaron valores para días a floración en promedio de 53.48 días para los individuos utilizados como padres, en tanto que los híbridos presentaron 47.8 días a floración, datos muy similares a los obtenidos con las colectas procedentes del estado de Chihuahua.

#### 4.3.4 Numero de Hojas

El análisis de varianza realizado para el número de hojas a la primera floración, también mostro diferencias significativas como puede observarse en el Cuadro 15.

**Cuadro 15. Análisis de varianza y coeficiente de variación de la variable de número de hojas.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>GL</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>F<sub>cal.</sub></b>	<b>Sig.*</b>
Colecta	16	5731.118	358.195	4.141	**
Bloque	1	98.941	98.941	1.144	NS
Error	16	1384.059	86.504		
Total	33	28066			
Sig.*=Significancia				C.V.(%)=59.70	

Debido a que la diferencia entre las colectas con respecto al Número de Hojas a la primera floración es altamente significativa, se procedió a elaborar la prueba de comparación de medias, la cual se observa en el Cuadro 16.

**Cuadro 16. Prueba de Tukey para la comparación de medias para la variable número de hojas a la primera floración.**

Colecta	Promedio	Subconjunto		
		1	2	3
SLP02	13.1	a		
C1M6	13.2	a		
EdoMex	14.0	a	b	
C2M1	16.0	a	b	
C2M6	16.3	a	b	
Chi02	16.5	a	b	
SLP10	19.0	a	b	c
Chi01	21.1	a	b	c
C2M7	21.6	a	b	c
SLP04	23.1	a	b	c
C2M4	23.6	a	b	c
SLP06	24.3	a	b	c
C1M3	24.7	a	b	c
SLP05	33.5	a	b	c
C1M1	39.0	a	b	c
SLP03	52.7		b	c
SLP11	56.7			c

Para la variable de número de hojas a la primera floración se encontraron diferencias significativas entre las distintas colectas de higuera analizadas. Como resultado de la prueba para la comparación de medias se formaron tres grupos diferentes estadísticamente. El primer grupo incluyó 15 genotipos y está conformado por variedades de los estados de San Luis Potosí, Nuevo León, Chihuahua y Estado de México, los cuales presentaron los valores más bajos con un promedio que va de las 13 a las 39 hojas a la primera floración, mientras que el grupo con la mayor cantidad de hojas a la primera floración estuvo

conformado por genotipos de San Luis Potosí, Nuevo León y Chihuahua, siendo las colectas SLP03 y SLP11 las que presentaron un mayor número de hojas, cuyo promedio fue de 52.7 y 56.6 hojas respectivamente.

#### 4.3.5 Altura de planta

Se llevo a cabo el análisis de varianza de la variable Altura de planta, el cual mostro diferencias altamente significativas entre colectas como puede observarse en el Cuadro 17.

**Cuadro 17. Análisis de varianza y coeficiente de variación para la variable altura de planta**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>GL</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>F<sub>cal.</sub></b>	<b>Sig.*</b>
Colecta	16	20451.97	1278.248	8.36	**
Bloque	1	446.419	446.419	2.92	NS
Error	16	2446.501	152.906		
Total	33	131610.4			

Sig.\*=Significancia

C.V.(%)=47.13

Debido a que se mostró diferencia significativa entre genotipos, se llevo a cabo la prueba de medias de la variable altura de planta, misma que se muestra en el Cuadro 18.

**Cuadro 18. Prueba de Tukey para la comparación de medias para la variable altura de planta.**

<b>Colecta</b>	<b>Promedio</b>	<b>Subconjunto</b>			
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Chi01	16.4	a			
Chi02	29.0	a	b		
C1M6	30.4	a	b		
C2M7	36.2	a	b	c	
SLP10	39.0	a	b	c	

Continúa...



**Cuadro 17. Continuación.**

C2M1	42.3	a	b	c	
SLP04	48.3	a	b	c	d
C1M3	49.8	a	b	c	d
SLP06	51.6	a	b	c	d
C2M6	57.4	a	b	c	d
SLP03	62.5	a	b	c	d
SLP02	71.4	a	b	c	d
SLP05	77.6		b	c	d
C1M1	83.0		b	c	d
C2M4	87.1			c	d
SLP11	91.0			c	d
EdoMex	102.0				d

En relación a la altura de la planta a la primera floración, las 17 colectas utilizadas mostraron diferencias significativas entre ellas, lo cual pone de manifiesto las diferencias de adaptación y desarrollo de las diversas colectas a la región donde se realizó el estudio.

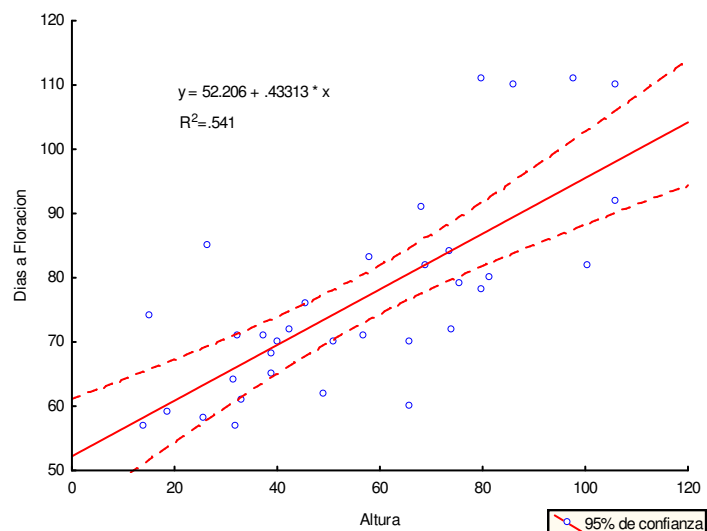
Como resultado de la prueba para la comparación de medias, se formaron tres grupos estadísticamente diferentes. En el grupo de colectas con mayor altura a la primera floración, se observa que los promedios de las alturas oscilan entre los 48 cm hasta los 102 cm; la Colecta Chi01 fue la que menor altura reporto con 16 cm a la primera floración, aunque fue estadísticamente igual a otras 11 colectas de los estados de Chihuahua (Chi02), Nuevo León (C1M6, C2M7, C2M1, C1M3 y C2M6) y San Luis Potosí (SLP10, SLP04, SLP06, SLP03 y SLP02).

Al respecto, De Arruda *et al.* (2010) reportaron alturas de plantas que oscilan entre los 0.90 m hasta los 2.3 m, formándose dos grupos estadísticamente diferentes analizando 15 genotipos de higuera. Joshi *et al.* (2002) reportó alturas bajas, muy similares a las presentadas por las colectas procedentes del estado de Chihuahua; ellos reportan alturas de 51.9 cm para los individuos utilizados como progenitores en tanto que para los híbridos reporto 53.53 cm de altura. Koutroubas *et al.* (1999) en su investigación, realizada en la zona

mediterránea (Grecia) reporto alturas desde los 79 cm hasta los 278 cm. Raja y Matcha (2010) midieron el efecto de la fertilización nitrogenada encontrando que a mayor sea esta, presentó mayor altura (111.75 cm) en tanto que a menor concentración de fertilizante (0%) la altura de la planta fue apenas de 69.62 cm.

#### 4.3.6 Relación entre altura de planta y días a floración

Durante el desarrollo del ensayo, visualmente se observó una relación entre altura y días a floración; el análisis de regresión para estas dos variables se observa en la Figura 62.

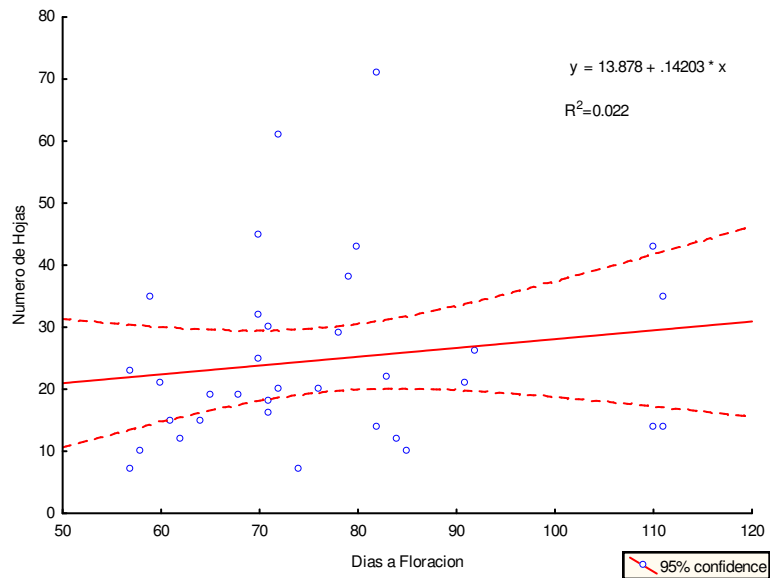


**Figura 62. Modelo de regresión para altura de planta y días a floración.**

El modelo de regresión calculado ( $p < 0.01$ ) para las variables días a floración y altura de planta muestra que existe una tendencia marcada en que las plantas con mayor altura, los días a floración se amplían siendo las plantas más precoces aquellas que presentaron una menor altura.

### 4.3.7 Relación entre días a floración y número de hojas

Del mismo modo, se obtuvo la relación existente entre días a floración y número de hojas. En la Figura 63 se observan los resultados del análisis de regresión.



**Figura 63. Modelo de regresión entre las variables número de hojas y días a floración.**

En base al modelo de regresión anterior ( $p < 0.01$ ) no se observa una relación marcada entre el número de hojas y los días a floración., por lo que la diferencia en el numero de hojas es particular a cada una de las diferentes colectas independientemente de los días a floración en que se encuentre la planta.

### 4.3.8 Tipo de Fruto

En relación al tipo de fruto se realizaron mediciones en las diferentes colectas para saber si se trataba de frutos dehiscentes o indehiscentes. Se llevo a cabo la medición del % de frutos dehiscentes, los cuales se muestran en el Cuadro 19.

**Cuadro 19. Porcentaje de frutos dehiscentes de cada una de las colectas de higuera  
analizadas.**

<b>Colecta</b>	<b>% de Dehiscentes</b>
SLP02	85.71
SLP05	83.33
C2M6	81.81
C1M3	77.38
C2M7	75.00
SLP06	75.00
SLP11	75.00
C2M1	70.00
C1M1	62.85
C2M4	62.50
EdoMex	50.00
SLP04	50.00
SLP10	30.00
SLP03	25.00
C1M6	12.50
Chi01	3.84
Chi02	1.78

Para la variable tipo de fruto, se observó que las colectas más dehiscentes (aquellas cuyos frutos abren cuando la flor aún se encuentra en la planta) son los individuos SLP02, SLP 05 y C2M6, en tanto que las colectas procedentes de Chihuahua (Chi01 y Chi02) fueron las que presentaron menos dehiscencia. Esta característica es muy importante en los sistemas de producción a gran escala, debido a que los genotipos que presentan un mayor porcentaje de dehiscencia tienden a presentar una menor cantidad de semilla producida, debido tanto a las pérdidas en campo, como también al momento de la cosecha.

Mazzani y Rodríguez (2009) mencionaron que durante el desarrollo de su investigación pudieron observar que la mayoría de las variedades utilizadas

presentaban una dehiscencia, siendo solo los genotipos mejorados aquellos que no presentaron esta característica.

Además, es importante mencionar que para explotaciones comerciales, es importante que los individuos no presenten una alta dehiscencia, debido a que esta característica reduce la cantidad de semilla cosechada.

#### 4.3.9 Largo y ancho de semilla

Para las variables largo y ancho de semilla, se llevaron a cabo los análisis de varianza de los datos con el fin de conocer si existían diferencias para estas características, los resultados se muestran en el Cuadro 20.

**Cuadro 20. Análisis de varianza y coeficiente de variación de las variables largo y ancho de semilla.**

Fuente de Variación	GL	Variable dependiente	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F <sub>cal.</sub>	Sig. **
Colecta	16	Largo	0.799	0.05	1180.47	**
		Ancho	0.42	0.026	1107.076	**
Bloque	1	Largo	1.30 10 <sup>-05</sup>	1.30 10 <sup>-05</sup>	0.306	NS
		Ancho	7.25 10 <sup>-05</sup>	7.25 10 <sup>-05</sup>	3.056	NS
Error	16	Largo	0.001	4.23 10 <sup>-05</sup>		
		Ancho	0	2.37 10 <sup>-05</sup>		
Total	33	Largo	32.081			
		Ancho	13.677			

Sig.\*=Significancia

C.V.(%)Largo=16.23  
C.V.(%)Ancho=18.08

Debido a que existen diferencias significativas entre colectas para el largo y ancho de la semilla, se llevo a cabo la prueba de comparación de medias. Para el caso de la variable ancho de semilla, dicha prueba se presenta en el Cuadro 21.

**Cuadro 21. Prueba de Tukey para la comparación de medias para la variable ancho de semilla.**

Genotipo	Promedio	Subconjunto						
		1	2	3	4	5	6	7
SLP10	.5063	a						
C2M4	.5113	a						
C1M1	.5204	a						
C1M3	.5421		b					
C2M6	.5425		b					
SLP11	.5471		b					
SLP06	.5475		b					
SLP04	.5796			c				
C2M7	.5801			c				
SLP05	.5825			c				
SLP02	.5917			c				
C2M1	.6300				d			
EdoMex	.7315					e		
SLP03	.7521					e		
C1M6	.7857						f	
Chi01	.8259							g
Chi02	.8390							g

Para el caso de largo de semilla, la prueba de Tukey para la comparación de medias, se presenta en el Cuadro 22.

**Cuadro 22. Prueba Tukey para la comparación de medias para la variable largo de semilla.**

Colecta	Promedio	Subconjunto										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
C2M4	.8200	a										
SLP05	.8213	a										
SLP10	.8358	a	b									
SLP11	.8408	a	b	c								

Continúa...

**Cuadro 22. Continuación.**

---

C1M1	.8508	b	c	d					
C2M6	.8538	b	c	d					
C1M3	.8642		c	d	e				
SLP06	.8746			d	e	f			
C2M7	.8851				e	f			
SLP04	.8942					f	g		
SLP02	.9154						g		
C2M1	.9550							h	
SLP03	1.0842								i
C1M6	1.1425								j
Chi01	1.1526								j
Chi02	1.1680								j
EdoMex	1.3480								k

---

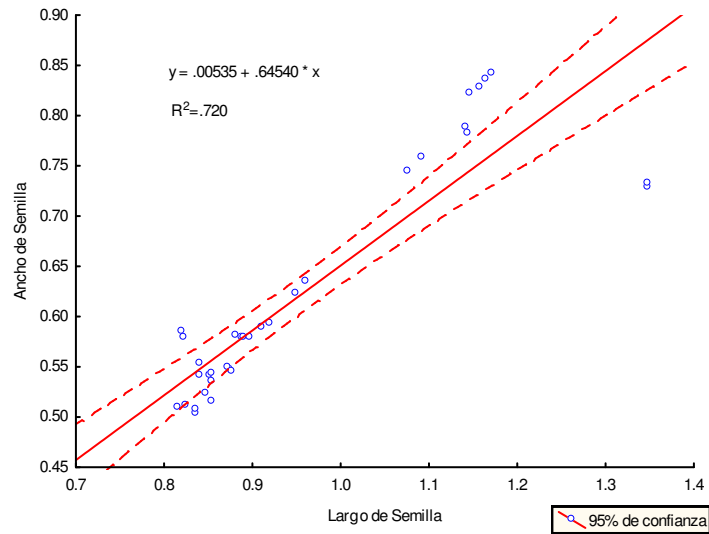
Los resultados con respecto al ancho de las semillas indicaron que las colectas procedentes del estado de Chihuahua (Chi01 y Chi02) presentaron las semillas más anchas con promedios de 0.8259 cm y 0.8390 cm respectivamente, los cuales fueron estadísticamente iguales, en tanto que las colectas SLP10, C2M4 y C1M1 conforman el grupo de individuos con semillas mas angostas, con promedios de 0.5063 cm, 0.5113 cm y 0.5204 cm, respectivamente.

Para el caso de largo de semillas, la colecta procedente del Estado de México fue la que presento el mayor valor en comparación a las demás con 1.348 cm de promedio, seguido por las Colectas del Estado de Chihuahua (Chi02 y Chi01) con 1.168 cm y 1.152 cm, respectivamente.

Goytia *et al.* (2011) reportó una gran variabilidad en el tamaño de la semilla, encontrando semillas desde 0.5 cm<sup>2</sup> hasta 2.41 cm<sup>2</sup>, siendo mayores a los tamaños reportados en otras investigaciones.

### 4.3.10 Relación entre largo y ancho de semilla

Se llevo a cabo una regresión, con el fin de conocer el nivel de relación existente entre ambas variables, dicha relación puede observarse en la Figura 64.



**Figura 64. Modelo de Regresión entre las variables largo y ancho de semilla**

Con base al modelo de regresión calculado ( $p < 0.01$ ), se puede observar una marcada correlación entre ambas características, con lo cual se pudo demostrar que la relación es directamente proporcional, pues a mayor largo de semilla, mayor será la anchura de la misma, Mazzani y Rodríguez, 2009 mencionaron en su investigación que los valores de largo, ancho y la relación entre estas son variables de suma importancia para la clasificación morfológica de la higuera, además de que estos valores están relacionados positivamente con el peso de la semilla y por lo tanto el rendimiento del cultivo.



### 4.3.11 Tamaño de la Inflorescencia.

Se realizó el análisis de varianza para los datos de la variable tamaño de la inflorescencia, el cual se muestra en el Cuadro 23.

**Cuadro 23. Análisis de varianza y coeficiente de variación para la variable tamaño de inflorescencia.**

Fuente de Variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F <sub>cal.</sub>	Sig.*
Colecta	16	1718.225	107.389	9.306	**
Bloque	1	6.823	6.823	0.591	NS
Error	16	184.641	11.54		
Total	33	21997.69			

Sig.\*=Significancia C.V.(%)=31.29

Debido a que el análisis de varianza mostro una diferencia significativa entre las diferentes colectas para la variable tamaño de inflorescencia, se llevo a cabo la prueba de Tukey para la comparación de medias, el cual se observa en el Cuadro 24.

**Cuadro 24. Prueba de Tukey para la comparación de medias para la variable tamaño de inflorescencia.**

Colecta	Promedio	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
Chi01	11.0988	a				
Chi02	13.8656	a	b			
C1M6	14.0100	a	b			
C2M1	19.3400	a	b	c		
SLP03	20.5000	a	b	c		
EdoMex	21.1250	a	b	c		
C1M1	23.9336	a	b	c	d	
C2M7	25.1625		b	c	d	

Continúa...

**Cuadro 23. Continuación.**

SLP06	25.3267	b	c	d	
C2M6	25.4909	b	c	d	e
SLP02	25.9946	b	c	d	e
C2M4	26.0375	b	c	d	e
C1M3	27.1631	b	c	d	e
SLP10	29.3600		c	d	e
SLP05	30.2333		c	d	e
SLP04	35.6500			d	e
SLP11	38.9250				e

Con respecto a la variable tamaño de inflorescencia se encontró que existen diferencias altamente significativas entre las 17 colectas analizadas. La prueba de medias arrojó cinco grupos, donde destacan con floraciones más pequeñas las colectas procedentes del estado de Chihuahua (Chi01y Chi02), con inflorescencias de 11.1 cm en promedio, en tanto que las inflorescencias más grandes las presentó la Colecta SLP11, con un promedio de 38.9 cm.

Joshi *et al.* (2002) reportaron tamaños de inflorescencia que oscilan entre los 27.50 cm y los 29.71 cm, la diferencia entre ambos tamaños es que el primero se trata del tamaño de inflorescencia de los individuos considerados como progenitores y el segundo se trata de los híbridos resultantes. Mazzani y Rodríguez (2009) reportaron un tamaño promedio de 36.9 cm en genotipos de higuera sembrados en Maracay, Estado Aragua, Venezuela.

Comparados con los datos obtenidos, las diferentes colectas analizadas presentan buenos promedios de longitud de inflorescencia, considerando que su tamaño en algunos casos, como el de la Colecta SLP11 supera los promedios reportados, lo cual permite inferir que existe el potencial necesario para la implementación de la producción de semilla de higuera a gran escala con los materiales disponibles en la región.

### 4.3.12 Numero de Frutos por Inflorescencia

Se contabilizo el número de frutos por inflorescencia, los datos fueron sometidos a un análisis de varianza, cuyos resultados se observan en el Cuadro 25.

**Cuadro 25. Análisis de varianza y coeficiente de variación para la variable número de frutos por inflorescencia.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>GL</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>F<sub>cal.</sub></b>	<b>Sig.*</b>
Colecta	16	127919.896	7994.994	19.113	**
Bloque	1	604.302	604.302	1.445	NS
Error	16	6692.868	418.304		
Total	33	457293.895			

Sig.\*=Significancia

C.V.(%)=31.29

Debido a que en el análisis de varianza resulto altamente significativo se procedió a elaborar el análisis para la comparación de medias para esta misma variable (Cuadro 26).

**Cuadro 26. Prueba de Tukey para la comparación de medias de la variable frutos por inflorescencia.**

<b>Colecta</b>	<b>Promedio</b>	<b>Subconjunto</b>			
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
EdoMex	47.5	a			
SLP03	47.5	a			
SLP02	48.23	a			
Chi01	48.82	a			
Chi02	49.95	a			
C2M1	57.2	a	b		
C1M6	79.43	a	b	c	
SLP04	81.25	a	b	c	
C1M1	86.14	a	b	c	
C2M6	93.27	a	b	c	

Continúa...

**Cuadro 26. Continuación.**

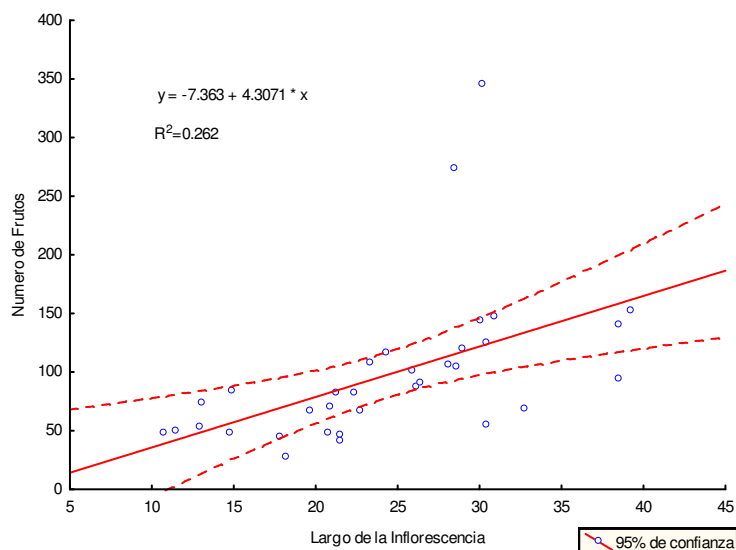
C2M4	94.06	a	b	c
C2M7	100.5	a	b	c
SLP06	103.3	a	b	c
C1M3	127.54	a	b	c
SLP05	133.83		b	c
SLP11	146.75			c
SLP10	309.25			d

Para la variable número de frutos por inflorescencia se encontró que existen diferencias altamente significativas entre colectas de higuera. La prueba para la comparación de medias de la variable frutos por inflorescencia clasificó las 17 colectas en 4 grupos, destacando el grupo “d”, el cual está integrado por la colecta SLP10 con 309 frutos por inflorescencia, en tanto que el grupo “c” se encuentra integrado por las colectas SLP11, SLP05, C1M3, SLP06, C2M7, C2M4, C2M6,

Joshi *et al.* (2002) reporta que para los individuos utilizados como progenitores en su investigación presentaron 62.39 frutos por inflorescencia en tanto que los híbridos obtenidos presentaron 71.61 frutos, siendo menores estos valores a los obtenidos de las Colectas analizadas, lo cual indica el alto potencial que se tiene en la región para la producción. Considerando además los resultados de Joshi *et al.* (2002), es factible realizar la hibridación de los materiales obtenidos con el fin de incrementar el número de frutos por inflorescencia, lo cual supondría un aumento en la producción, a pesar de esto, las diversas colectas analizadas presentan promedios altos, lo cual nos permite enfatizar el potencial de este cultivo en la región noreste de la República Mexicana.

#### **4.3.13 Relación entre largo de inflorescencia y número de frutos**

Se procedió a la realización de una regresión, con el fin de conocer cuantitativamente la relación entre ambas variables, los resultados de dicha regresión se observan en la Figura 65.



**Figura 65. Análisis de Regresión entre las variables largo de inflorescencia y número de frutos.**

Con base al análisis de regresión anterior ( $p < 0.01$ ) se observó que existe una asociación entre las variables largo de la inflorescencia y número de frutos por inflorescencia, a pesar de que el valor de  $R^2$  es bajo, esto se debe a que la colecta SLP10 presentó un mayor número de frutos en relación con el largo de la inflorescencia comparada con el resto de las colectas, aunque el comportamiento que se muestra permite suponer cierto grado de dependencia entre estas variables.

El tamaño de las inflorescencias determinan el número de frutos por inflorescencia y por lo tanto son directamente proporcionales al rendimiento, diversos autores (Mazzani y Rodríguez 2009; Joshi et al., 2002) hacen referencia a esta asociación y su importancia en sistemas intensivos de producción de semilla, por lo cual es deseable implementar plantaciones con genotipos cuya longitud de inflorescencia sea alta, lo que implica un promedio mayor de frutos por inflorescencia.

#### 4.3.14 Características físicas del fruto

Dentro de esta característica se midió el porcentaje de individuos que presentaban frutos con espinas punzantes y el porcentaje de individuos que desprendían la cutícula del fruto. Los resultados de estas mediciones se observan en el Cuadro 27.

**Cuadro 27. Porcentaje de individuos con frutos espinosos y cutícula persistente.**

<b>Genotipo</b>	<b>% Frutos con Espinas Punzantes</b>	<b>% Frutos de cutícula persistente</b>
SLP02	71.8	78.1
C2M4	75.0	75.0
C2M1	80.0	100.0
SLP11	80.0	80.0
C1M6	87.5	12.5
C2M7	87.5	87.5
SLP03	87.5	100.0
SLP04	87.5	87.5
C2M6	90.9	59.1
SLP10	91.6	91.6
C1M3	92.8	85.7
Chi02	94.1	16.2
C1M1	100.0	62.8
Chi01	100.0	11.5
EdoMex	100.0	50.0
SLP05	100.0	100.0
SLP06	100.0	83.3

Se llevo a cabo el análisis de varianza de ambas características, el cual se muestra en el Cuadro 28.

**Cuadro 28. Análisis de varianza y coeficiente de variación para la variable porcentaje de individuos con frutos con espinas punzantes (%F.E.) y cutícula persistente (%F.C.P.)**

Fuente de Variación	Variable Dependiente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F <sub>cal.</sub>	Sig.*
Colecta	%F.E.	16	0.241	0.015	0.673	NS
	%F.C.P.	16	2.907	0.182	5.529	**
Bloque	%F.E.	1	0.003	0.003	0.141	NS
	%F.C.P.	1	0.006	0.006	0.168	NS
Error	%F.E.	16	0.358	0.022		
	%F.C.P.	16	0.526	0.033		
Total	%F.E.	33	28.126			
	%F.C.P.	33	19.762			

Sig.\*=Significancia

C.V.(%)%F.E.=15.01  
C.V.(%)%F.C.P.=46.58

Se puede observar que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre colectas para el porcentaje de frutos espinosos, en cambio, para el porcentaje de frutos con cutícula persistente si mostro una diferencia significativa entre colectas, por lo cual se llevo a cabo el análisis para la comparación de medias de esta variable (Cuadro 29).

**Cuadro 29. Prueba de Tukey para la comparación de medias de la variable porcentaje de individuos con cutícula persistente.**

Colecta	Promedio	Subconjunto			
		1	2	3	4
Chi01	0.11	a			
C1M6	0.12	a	b		
Chi02	0.16	a	b	c	
EdoMex	0.5	a	b	c	d
C2M6	0.59	a	b	c	d
C1M1	0.62	a	b	c	d
C2M4	0.75	a	b	c	d
SLP11	0.75	a	b	c	d
SLP10	0.80	a	b	c	d
SLP05	0.83		b	c	d

*Continúa...*

**Cuadro 29. Continuación.**

C1M3	0.85	c	d
C2M7	0.87		d
SLP03	0.87		d
SLP06	0.91		d
C2M1	1		d
SLP02	1		d
SLP04	1		d

Las colectas SLP06, SLP05, EdoMex, Chi01 y C1M1 tienen un 100% de frutos espinosos, mientras que la colecta SLP02 fue la que menos % presento con un 71.875%. Tan bien cabe mencionar, que las colectas cuya cobertura del fruto fue más persistente son SLP05 (100%) y C2M1 (100%),

El análisis de varianza para la variable porcentaje de frutos con cutícula persistente mostro diferencias altamente significativas. En la prueba para la comparación de medias se observa la formación de cuatro grupos diferentes, siendo poco clara la diferencia entre estos. Se observa que el grupo “d” se encuentra integrado por colectas que presentan una mayor retención de la cutícula ( $\geq 50$ ) que recubre las capsulas de los frutos.

En relación a la característica de frutos espinosos, Ashok *et al.* (2009) reportaron en su estudio que la mayoría de los genotipos estudiados (ocho de nueve en total) presentan esta característica, siendo relacionado con un gen co-dominante, donde la presencia de manera heterocigótica (Ss) presenta frutos espinosos, en cambio, cuando se presenta de manera homocigótica solo el gen recesivo (ss), existe la presencia de frutos no espinosos.



### 4.3.15 Producción de semilla y aceite

#### 4.3.15.1 Producción de semilla

Se llevo a cabo el análisis de la varianza de los datos (Anexo 23) de la producción de semilla de las diferentes colectas de higuera, cuyos resultados pueden observarse en el Cuadro 30.

**Cuadro 30. Análisis de varianza y coeficiente de variación de la variable producción de semilla.**

Fuente de Variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F <sub>cal.</sub>	Sig.**
Colecta	16	2097648.98	131103.061	3328.266	**
Bloque	1	129.224	129.224	3.281	NS
Error	16	630.253	39.391		
Total	34	9297442.28			

Sig.\*=Significancia C.V.(%)=54.80

Debido a que se encontraron diferencias significativas, se llevo a cabo la prueba de comparación de medias, la cual se muestra en el Cuadro 31.

**Cuadro 31. Prueba de Tukey para la comparación de medias para la variable producción de semilla (kg ha<sup>-1</sup>)**

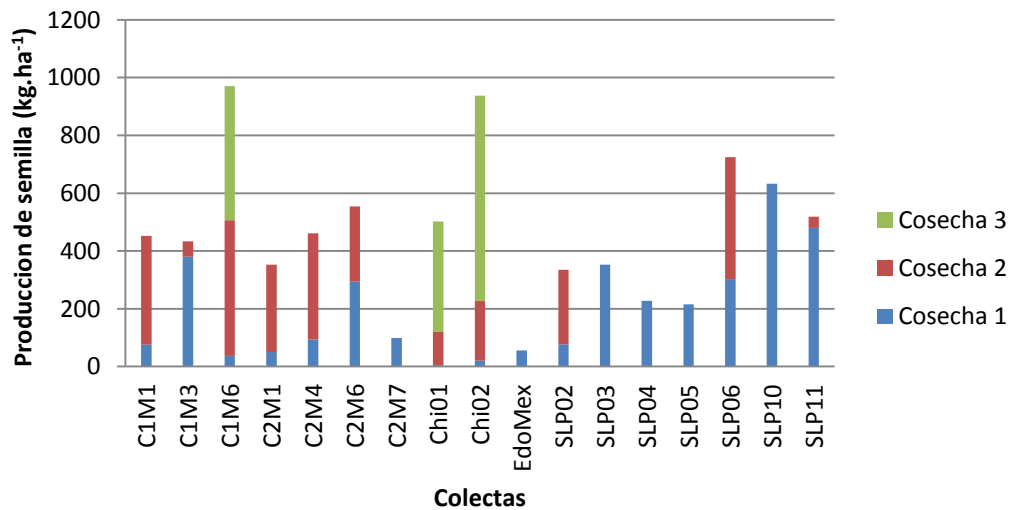
Colecta	Promedio	Subconjunto											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
EdoMex	56.2	a											
C2M7	198.7		b										
SLP05	215.3			c									
SLP04	227.1				c								

*Continúa...*

**Cuadro 31. Continuación.**

SLP02	334.8	d			
C2M1	352.4	d			
SLP03	352.5	d			
C1M3	433.1		e		
C1M1	451.8		e	f	
C2M4	461.5			f	
Chi01	502.1				g
SLP11	518.2				g
C2M6	553.8				h
SLP10	632.6				i
SLP06	724.4				j
Chi02	937.2				k
C1M6	970.0				l

La distribución de la producción en relación al número de cosechas se muestra en la Figura 66.



**Figura 66. Producción de semilla (kg.ha<sup>-1</sup>) de las 17 colectas de higuera utilizadas en el ensayo.**

De acuerdo a los datos obtenidos para la variable producción de semilla destacaron la colecta Chi02, alcanzando una producción de 937.07 kg ha<sup>-1</sup> distribuidos en tres diferentes cosechas, la colecta C1M6 con 970 kg ha<sup>-1</sup> distribuidos también en 3 cosechas y la colecta SLP06 con 724.46 kg ha<sup>-1</sup>, los cuales se obtuvieron en tan solo dos colectas.

Cabe destacar que la colecta Chi02 es de porte más pequeño a simple vista en comparación a las demás, por lo cual se estima puede tener un potencial de producción más elevado si se aumenta la densidad de población; además se trata de una colecta indehisciente, lo cual permite su cosecha en forma más eficiente pues la semilla permanece dentro del fruto y no hay pérdida de la misma.

En comparación con otros ensayos, el rendimiento de semilla es muy similar a esos. Camacho *et al.* (2007) reportaron una producción máxima de 696.5 kg ha<sup>-1</sup> en siembras realizadas en la Región de Ucayali, Perú, en tanto que Samayoa (2007) mencionó que algunas variedades brasileñas mejoradas presentan una producción de 1400 kg ha<sup>-1</sup>, mientras que en promedio las variedades colombianas rindieron entre los 800 y 1000 kg ha<sup>-1</sup>. Por otro lado Baldwin y Cossar (2009) reportaron una producción de entre 89 y 1954 kg ha<sup>-1</sup> en un ensayo realizado para determinar la influencia de la fecha de siembra, encontrando que las regiones más al norte del valle del Mississippi en Estados Unidos y siembras tempranas fueron las que mayor productividad presentaron.

En relación a otras regiones, en la India, Basappa (2005) reportó una producción de semilla en la región de Andhra Pradesh de 519 kg ha<sup>-1</sup>, 536 kg ha<sup>-1</sup> y 760 kg ha<sup>-1</sup> utilizando un sistema biointensivo e integrado de manejo de plagas (*Achaea janata*, *Conogathis punctiferalis*, *Dechocrosis punctiferalis* G., *Spodoptera litura* F. y *Amsacta sp.*) y enfermedades (*Botrytis ricini* G., *Fusarium oxisporum* sp *Ricin* y *Ptytophthora parasitica*) siendo similar el resultado obtenido con el manejo químico con promedios de 529, 542 y 767 kg ha<sup>-1</sup>, mientras que para un sistema sin manejo de plagas reporta una producción de 398, 433 y 512 kg ha<sup>-1</sup>. Por otro lado, Lavanya *et al.* (2012) reportaron una

producción de semilla de 1580 kg ha<sup>-1</sup> en la región de Hyderabad, India. En el caso de Brasil, Dourado *et al.* (2008) reportaron una máxima producción de semilla de 2956 kg ha<sup>-1</sup> durante dos años de producción, utilizando un sistema intensivo de fertilización, encontrando que la fertilización nitrogenada no presentó un efecto en los niveles productivos, en tanto que para la fertilización potásica encontraron un efecto negativo reduciendo la producción en casi 200 kg ha<sup>-1</sup> y para la fertilización fosfórica reportaron un efecto positivo incrementando la producción en casi 1200 kg ha<sup>-1</sup>. Para la zona del mediterráneo Koutroubas *et al.* (1999) reportaron una producción total de 2.5 a 5 ton ha<sup>-1</sup> en un rango de tres años, considerando al cultivo como perenne.

#### 4.3.15.2 Contenido de Aceite

Se llevo a cabo el análisis de varianza de los datos obtenidos de la producción de aceite (Anexo 23), el cual se muestra en el Cuadro 32.

**Cuadro 32. Análisis de varianza y coeficiente de variación de la variable producción de aceite.**

Fuente de Variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F <sub>cal.</sub>	Sig.*
Colecta	17	322.222	18.954	3.392	*
Bloque	1	16	16	2.863	NS
Error	17	95	5.588		
Total	36	79020			

Sig.\*=Significancia; \* Significativo;

\*\* Altamente significativo;

C.V.(%)=7.53

Se puede observar que existe una diferencia significativa entre los genotipos. Debido a esto se llevo a cabo la prueba de Tukey cuyos resultados se muestran en el Cuadro 33.

**Cuadro 33. Prueba de Tukey para la comparación de medias de la variable producción de aceite (%)**

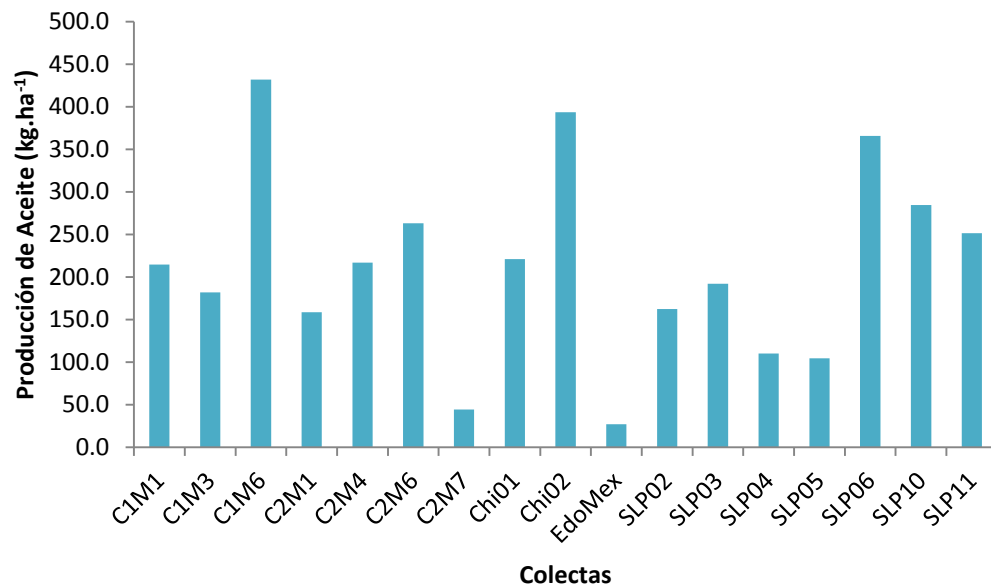
Genotipo	Promedio (%)	Subconjunto	
		1	2
C1M3	42.00	a	
Chi02	42.00	a	
Chi01	44.00	a	
C1M6	44.50	a	
SLP11	44.50	a	
C2M1	45.00	a	b
C2M7	45.00	a	b
SLP06	45.00	a	b
C2M4	47.00	a	b
C1M1	47.50	a	b
C2M6	47.50	a	b
EdoMex	48.00	a	b
Mich	48.50	a	b
SLP03	48.50	a	b
SLP04	48.50	a	b
SLP10	48.50	a	b
SLP05	50.50	a	b
SLP02	54.50		b

Se puede observar en el Cuadro 32 que existen 2 grupos diferentes siendo la colecta C1M3 la que menos concentración de aceite presenta junto con las otras 16 colectas incluyendo a Chi02, Chi01, C1M6 y SLP11, mientras que la mayor cantidad de aceite se obtuvo de la colecta SLP02 con 54.5 %, la cual conforma el grupo b, estadísticamente igual a las colectas que conforman el grupo ab.

Joshi *et al.* (2002) reportaron como resultado de su investigación que las semillas de *Ricinus communis* L. utilizadas presentaron entre un 49.67% y 49.9% de aceite, dato muy similar a los % obtenidos en la presente

investigación. Navas (2008) mencionó que el máximo porcentaje de aceite en la higuierilla es del 50% mientras que Mazzani (2007) en cambio reportó que el promedio oscila entre el 42% y 55%. Goytia *et al.* (2011) reportaron rangos en el % de contenido de aceite que oscilan entre 12.2% y 64.84%, siendo en algunos casos mucho menores a los % determinados para las colectas de la presente investigación. Koutroubas *et al.* (1999) reportaron contenidos de aceite que varían entre el 44.5% hasta el 54.2%, mencionando que la diferencia es inherente a cada una de las diferentes variedades utilizadas en la investigación.

En base a la producción de semilla total obtenida durante el ciclo (el cual para las condiciones de la región se considero como anual iniciando el mes de Abril y finalizando el mes de Noviembre) y el porcentaje de aceite en relación al peso total de semilla, se estimó la producción total de aceite por hectárea, la cual se presenta en la Figura 67.



**Figura 67. Producción total de aceite por hectárea**

Para el genotipo C1M6 se encontró que la producción estimada de aceite es de 431.7 kg ha<sup>-1</sup>, para la colecta Chi02 es de 393.6 kg ha<sup>-1</sup> y para la colecta SLP06 de 365.9 kg ha<sup>-1</sup>, siendo estas las tres más altas (Anexo 23).

Lavanya *et al.* (2012) reportaron una producción de 754 kg ha<sup>-1</sup> de aceite utilizando híbridos producidos en la India, en comparación con estos datos, las colectas utilizadas en la investigación presentaron una producción inferior a la antes mencionada, esto debido principalmente a la producción de semilla, debido a que la producción de semilla fue menor a la de los híbridos (la cual oscilo entre 1130 y 1580 kg.ha-1), por lo cual el nivel de producción de aceite puede aumentarse si la producción de semilla se aumenta.

#### 4.3.16 Color de Tallo, Hoja y Nervadura

En relación a las variables cualitativas, se estimo la frecuencia de color del tallo, el color de la hoja y de la nervadura encontrando una gran variabilidad entre genotipos, como se observa en el Cuadro 34.

**Cuadro 34. Color de tallo, nervadura y hoja de los distintos genotipos de higuera.**

Variedad	Color de Tallo	Color de Nervadura	Color de la Hoja
C1M1	Verde	Amarillo	Verde
C1M3	Verde	Amarillo	Verde
C1M6	Mixto	Amarillo	Mixto
C2M1	Verde	Amarillo	Verde
C2M3	Verde	Amarillo	Verde
C2M4	Verde	Amarillo	Verde
C2M5	Rojo	Amarillo	Mixto

**Continúa...**

**Cuadro 34. Continuación.**

---

C2M6	Mixto	Amarillo	Verde
C2M7	Rojo	Amarillo	Mixto
Chi01	Verde	Amarillo	Verde
Chi02	Verde	Amarillo	Verde
EdoMex	Verde	Amarillo	Verde
SLP02	Verde	Amarillo	Verde
SLP03	Verde	Amarillo	Verde
SLP04	Rojo	Rojo	Rojo
SLP05	Rojo	Rojo	Rojo
SLP06	Rojo	Rojo	Rojo
SLP07	Rojo	Rojo	Rojo
SLP09	Rojo	Rojo	Rojo
SLP10	Verde	Amarillo	Verde
SLP11	Rojo	Amarillo	Rojo

---

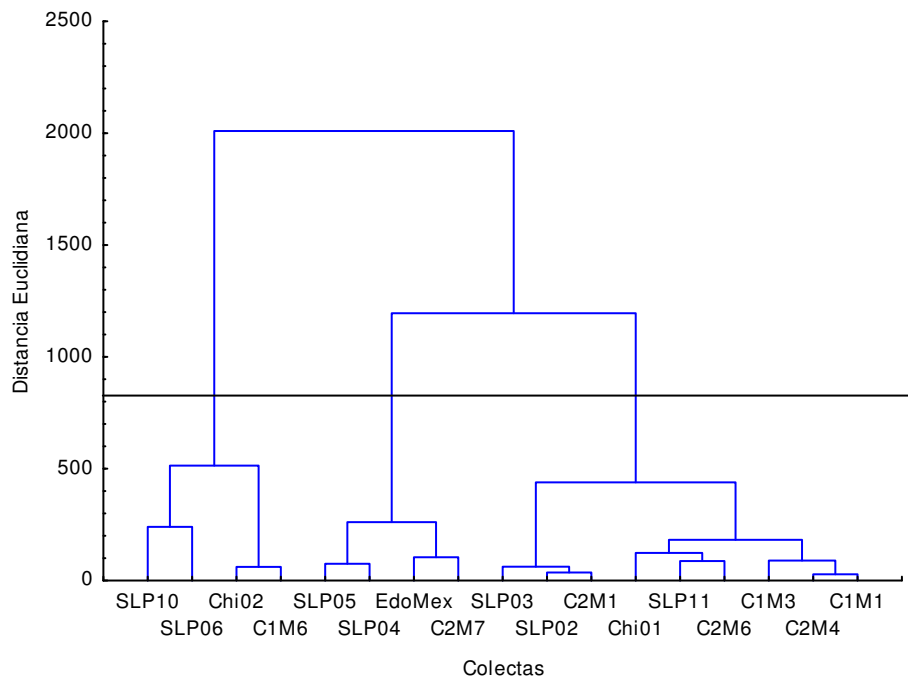
\*Color Mixto=Se presenta tanto el color rojo como el verde en la misma estructura.

En todas las variedades, independientemente del color, las hojas fueron pecioladas, palmatolobadas y dentadas. Considerando los datos obtenidos de la caracterización morfológica, existe una gran diversidad entre las diferentes colectas, mostrando diferencias significativas en cada una de las diferentes variables analizadas.



#### 4.3.17 Diferenciación en base a la morfología de la higuera.

Utilizando los datos obtenidos de las características morfológicas (días a la primera floración, número de hojas, altura de planta, tamaño de la inflorescencia, número de inflorescencias, largo y ancho de semilla, número de frutos por inflorescencia, tipo del fruto, características físicas del fruto y color de hoja, tallo y nervadura) se llevó a cabo la agrupación de las colectas elaborando un dendrograma utilizando el método de Ward, el cual permitió clasificar las distintas colectas, como se observa en la Figura 68.



**Figura 68. Dendrograma de clasificación morfológica de las 17 colectas de higuera.**

El dendrograma anterior muestra la formación de tres grupos estadísticamente diferentes, para la definición del criterio para la posición de la línea de corte se considero que la distancia de eslabonamiento fuera mayor a 400 unidades

euclidianas, debido a que al aumentar la distancia de eslabonamiento indica una mayor diferencia entre las distintas colectas.

El primer grupo se encuentra formado por la colecta SLP10, SLP06, Chi02 y C1M6, el grupo dos agrupo las colectas SLP5, SLP04, EdoMex y C2M7, finalmente el tercer grupo se constituye pos las colectas SLP03, SLP02, C2M1, Chi01, SLP11, C2M6, C1M3 C2M4 y C1M1, los promedios de las principales características de los grupos formados en el análisis de conglomerados se muestran en el Cuadro 35.

**Cuadro 35. Promedio de las variables morfológica de los grupos que se formaron de acuerdo al análisis de conglomerados.**

Grupo	Días a Floración	Largo de Inflorescencia (cm)	#Frutos	Dehiscente (%)	Prod. Semilla (kg.ha <sup>-1</sup> )	Prod. Aceite (kg.ha <sup>-1</sup> )
1	67.36	20.64	135.49	0.30	816.05	368.94
2	80.53	28.04	90.77	0.65	149.33	71.49
3	79.03	24.28	83.28	0.60	440.07	206.89

Se puede observar en el cuadro anterior, que el grupo uno presentó un promedio de 67 días al inicio de la floración, un largo de inflorescencia promedio de 20.64 cm, 135 frutos por inflorescencia, un 30% de frutos dehiscentes, además de presentar los más altos rendimientos de semilla y aceite, siendo de 816.05 kg.ha<sup>-1</sup> y 368.94 kg.ha<sup>-1</sup>, respectivamente.

Es importante destacar que en este grupo, la mayor cantidad de semilla puede ser atribuida a la característica de porcentaje de frutos dehiscentes, siendo en este, donde se manifestó con menor intensidad esta característica, pues solo el 30% del total de semillas en promedio se trató de frutos dehiscentes, lo que es de suma importancia en los sistemas de producción a gran escala, debido a que las perdidas en la cosecha se minimizan; además de lo anterior, el numero de

frutos por inflorescencia es sustancialmente mayor en comparación a los dos grupos anteriores, lo cual indica que los genotipos de este grupo presentaron un mejor comportamiento productivo en comparación a los otros; también es importante mencionar que este grupo, presentó el menor valor promedio de longitud de la inflorescencia y por el contrario un mayor número de inflorescencias, lo cual indica una relación inversa entre estas dos variables, además de que estas colectas, en promedio presentaron una producción dividida en poco más de dos cosechas (Anexo 24).

Finalmente como consecuencia de la alta producción de semilla, la producción de aceite en promedio fue la más alta (368.94 kg.ha<sup>-1</sup>). El grupo dos y tres presentaron características productivas poco deseables, como lo son una baja producción de semilla y por consecuencia de aceite, además de ser mas dehiscentes en comparación con el grupo 1, lo que indica que se trata de materiales que no son aptos para la producción en esta región del país.

De Arruda *et al.* (2010) reportaron en su investigación la formación de cuatro grupos utilizando 15 genotipos diferentes y considerando como variables la altura, diámetro de racimos, numero de entrenudos, altura de racimos y número de racimos.

Del mismo modo, Sarwar *et al.* (2010) reportaron en su investigación la formación de cuatro grupos diferentes utilizando un total de 27 genotipos híbridos de higuera, considerando las variables días a la madurez, altura de la planta, numero de flores por planta, longitud de la inflorescencia principal, longitud de inflorescencias secundarias, número de frutos por inflorescencia y producción de semilla.

## 4.4 Producción de Biodiesel

### 4.4.1 Determinación del protocolo de Transesterificación

Para la determinación de este protocolo se hicieron ensayos previos; estas pruebas se hicieron con aceite de maíz y aceite comercial de ricino, debido a la gran cantidad de metodologías descritas en la literatura para diversos tipos de materias primas.

En estas pruebas iniciales, la reacción de transesterificación produjo separación de fases (Figura 69), en cambio con el aceite de higuera no se llevo a cabo una separación visible de fases por lo cual se procedió a la realización de ensayos utilizando diferentes concentraciones de metanol, diferentes catalizadores (NaOH y KOH) y distintas concentraciones de catalizador (Cuadro 36)



Figura 69. Separación de fases de biodiesel producido con aceite de maíz.

**Cuadro 36. Concentración de aceite, metanol y catalizador para la transesterificación del aceite comercial de higuera a temperatura constante (60°C).**

#Prueba	Cantidad Aceite (g)	Cantidad alcohol (ml)	Cantidad NaOH (g)	%w/w aceite/OH	Agitación (rpm)	Tiempo (min)
1	50	75	0.9	1.8	600	30
2	50	75	0.9	1.8	600	60
3	50	75	0.6	1.2	600	30
4	50	75	0.6	1.2	1100	60
5	50	75	1.3	2.6	1100	30
6	50	75	1.3	2.6	1100	60
7	50	12.5	0.25	0.5	1100	30
8	50	12.5	0.25	0.5	1100	60

Las pruebas del uno al seis, no mostraron una separación clara de fases como puede observarse en la Figura 70, probablemente debido a la alta concentración de catalizador y metanol.



**Figura 70. Prueba 6 de transesterificación de aceite de higuera.**

Evera *et al.* (2010) reportaron en su investigación, que el exceso de catalizador produce una mayor cantidad de productos saponificados haciendo evidente la disminución en el rendimiento de la producción de biodiesel; además, mencionaron también que la reacción de transesterificación no llega a

completarse si la cantidad de metanol utilizado se encuentra por debajo del rango mínimo (definido por la concentración molar del aceite).

En cambio, para las pruebas 7 y 8 donde las concentraciones se disminuyeron de manera notable, se pudo observar una clara separación de fases entre biodiesel (parte superior) y residuos como glicerina, pigmentos, metanol no reaccionado y productos saponificados entre otros, dicha separación se puede observar en la Figura 71.



**Figura 71. Separación de fases de la prueba 7.**

Dermibas (2005) mencionó que los principales factores que afectan para una eficiente producción de biodiesel son la relación molar entre el aceite y el alcohol y la temperatura utilizada.

Ya que se obtuvo una clara separación de fases con el aceite comercial de higuierilla en el proceso de transesterificación, se llevo a cabo la producción de biodiesel utilizando como catalizador KOH; dichas pruebas pueden observarse en el Cuadro 37.

**Cuadro 37. Pruebas de transesterificación utilizando KOH como catalizador.**

#Prueba	Cantidad	Cantidad	Cantidad KOH (g)	%w/w aceite/OH	Agitación (rpm)	Tiempo (min)	Separación Fases
	Aceite (g)	alcohol (ml)					
7a	50	12.5	0.25	0.5	1100	30	si
8a	50	12.5	0.25	0.5	1100	60	si

Una vez obtenida la separación de fases en el proceso de transesterificación se llevo a cabo la producción de biodiesel con las muestras de aceite de las colectas disponibles producidas anteriormente.

#### 4.4.2 Producción de biodiesel a partir del aceite producido

Debido a que se produjo poca semilla de algunas colectas, solo se consideraron 10 para la producción de biodiesel; se contaba con gran cantidad de semilla adquirida previamente de la colecta del Estado de México (EdoMex), además de contar con semilla cosechada de la colecta de Michoacán (Mich) de los individuos trasplantados a campo y utilizados como barrera; en el Cuadro 38 se muestran dichas colectas, la cantidad de aceite utilizado, junto con la concentración de metanol, catalizador y la relación %w/w de aceite respecto al catalizador.

**Cuadro 38. Genotipos, cantidad de aceite, alcohol (metanol), catalizador (NaOH) y %w/w utilizados para la producción de biodiesel.**

Genotipo	Cantidad Aceite (g)	Cantidad alcohol (ml)	Cantidad NaOH (g)	%w/w aceite/OH
Edo Mex	257.94	64.3	1.3	0.50
SLP02	100	25	0.5	0.5
SLP05	100	25	0.5	0.5
C1M3	100	25	0.5	0.5

Continúa...

**Cuadro 38. Continuación.**

C2M4	100	25	0.5	0.5
C1M2	100	25	0.5	0.5
SLP11	100	25	0.5	0.5
Chi02	236.5	59.12	1.2	0.5
SLP10	160	0.8	0.8	0.5
C2M7	110.4	0.5	0.5	0.45
C2M6	137.8	0.7	0.7	0.5
Mich	200	50	1	0.5

Una vez realizada la transesterificación de las diferentes muestras en base a las condiciones antes mencionadas, se pudo observar que todas presentaron una clara separación de fases, además de presentar un buen rendimiento de biodiesel en relación a la cantidad de aceite utilizado, dichos datos se observan en el Cuadro 39.

**Cuadro 39. Producción de Biodiesel de las diferentes colectas evaluadas.**

<b>Genotipo</b>	<b>Cantidad Aceite (g)</b>	<b>Separación Fases</b>	<b>Biodiesel (g)</b>	<b>Glicerina (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
EdoMex	257.94	si	222.5	21.3	86.3
SLP02	100	si	93.2	8.8	93.2
SLP05	100	si	68.9	6.7	68.9
C1M3	100	si	85.6	16	85.6
C2M4	100	si	82.1	8.3	82.1
C1M2	100	si	86.9	13.1	86.9
SLP11	100	si	88.1	13.6	88.1
Chi02	236.5	si	197.3	28.9	83.4
SLP10	160	si	131.5	26.2	82.2
C2M7	110.4	si	90.3	25.1	81.8
C2M6	137.8	si	110.8	16.6	80.4
Mich	200	si	168.9	13.1	84.5

Ya finalizado el proceso de transesterificación se llevo a cabo la separación de fases con un matraz de decantación, este procedimiento consta de la



eliminación de la fase más densa (glicerina y desechos) regulando su salida del matraz como puede observarse en la Figura 72.



**Figura 72. Separación de fases del biodiesel producido.**

El rendimiento de biodiesel promedio fue de 1:0.84, lo que significa que por cada gramo de aceite transesterificado se obtiene 0.84 gramos de biodiesel. Además, se observó una clara diferenciación de fases, lo que significa que el proceso de alcoholisis se realizó de manera completa.

Gonzalez *et al.* (2006) reportaron un rendimiento total de biodiesel del 89%, utilizando una metodología basada en el uso de KOH y etanol y agitando durante 30 minutos a una temperatura de 35°C; el rendimiento bajo este procedimiento y según lo reportado fue 3% menor al encontrado en este trabajo experimental.

Una vez obtenido el biodiesel, se llevó a cabo el lavado con agua, con el objetivo de eliminar las impurezas, como lo son la glicerina, pigmentos, metanol no reaccionado y productos saponificados entre otros.

Se puede observar en la Figura 73 como se diferencia el biodiesel de los desechos que se disuelven en el agua.



**Figura 73. Primer lavado con agua del biodiesel producido**

Estos lavados se realizaron hasta que el agua adicionada se vea traslucida (Figura 74), en el caso de las muestras utilizadas se requirieron cuatro lavados para obtener biodiesel libre de desechos.



**Figura 74. Ultimo lavado del biodiesel para la eliminación de residuos.**

Finalmente, se llevó a cabo la evaporación de agua y clarificación del biodiesel colocando el biodiesel a 60° durante 15 minutos para que el agua pudiera evaporarse (Figura 75).



**Figura 75. Evaporación de agua y clarificación del biodiesel.**

Al respecto, Benavides *et al.* (2007) mencionaron que el máximo rendimiento de transesterificación se alcanzó a temperatura ambiente, con una relación metanol:aceite de 9 (9 unidades de metanol por cada unidad de aceite) y una concentración de NaOH de 0.8%. Guerrero *et al.* (2010) mencionaron que la temperatura óptima para la producción de Biodiesel fue de 50°C pues en su ensayo fue la que obtuvo un comportamiento más estable en su utilización como biocombustible. Por su parte Cavalcante *et al.* (2010) reportaron que la mayor producción de biodiesel se obtuvo con una concentración molar aceite: etanol de 1:11, utilizando 1.75% de KOH como catalizador con un tiempo de reacción de 90 minutos.

## **4.5 Análisis Molecular de Calidad del Biodiesel**

### **4.5.1 Contenido de Agua.**

Para las doce muestras de biodiesel disponibles se realizó la determinación del contenido del agua, cuyos resultados se muestran en el Cuadro 40.

**Cuadro 40 Contenido de Agua de las 12 diferentes muestras de biodiesel**

Colecta	Peso	Contenido de H <sub>2</sub> O	
		(ppm)	(%)
Chi02	0.0351	2612.5	0.2613
Mich	0.0352	1656.3	0.1656
EdoMex	0.0377	1702.9	0.1703
C1M2	0.0435	1813.8	0.1814
C1M3	0.0371	1824.4	0.1825
C2M4	0.0342	815.8	0.0816
C2M6	0.332	6088.2	0.6088
C2M7	0.0283	1532.6	0.1533
SLP02	0.0313	1488.8	0.1489
SLP05	0.0441	1356	0.1356
SLP10	0.0386	1414.5	0.1415
SLP11	0.0347	1331.4	0.1331
Diesel	0.2946	75.5	0.0076

Según los valores mínimos establecidos por la Norma EN 14214 (500 ppm máximo) ninguna de las muestras presenta condiciones para ser utilizadas como biodiesel puro. Es posible disminuir la cantidad de agua implementando un proceso de secado más eficiente al utilizado durante el experimento.

Debido a que el contenido de agua se modifica de manera proporcional en relación al contenido de agua que presente el diesel con que se va a mezclar, es posible que concentraciones bajas de biodiesel de higuera (considerando mezclas que pueden oscilar entre el 5%, 10%, 15% y 20%) puedan superar la norma de contenido de agua, siempre y cuando se combinen con diesel de calidad.

Canoira *et al.* (2010) reportaron un contenido de agua de 2000 ppm al elaborar el biocombustible en un biorreactor de 1.5 litros, siendo este dato similar al

contenido de agua del aceite de higuierilla utilizado en su experimento (1920 ppm), por otro lado menciona que al elaborar el biodiesel en un volumen mayor (50 litros) el contenido de agua fue de tan solo 353 ppm, haciendo referencia a que el alto contenido de agua del reactor de 1.5 litros es resultado de la poca eficiencia en el proceso de secado al que fue sometido el biodiesel después de la transesterificación.

#### 4.5.2 Densidad

Del mismo modo, se midió la densidad para las diferentes muestras de biodiesel de ricino disponibles, los resultados se presentan en el Cuadro 41.

**Cuadro 41. Densidad de las 12 muestras de biodiesel de ricino.**

<b>Muestra</b>	<b>Densidad (kg/m<sup>3</sup>)</b>
Chi02	948
Mich	944
EdoMex	939
C1M2	939
C1M3	968
C2M4	935
C2M6	974
C2M7	.97
SLP02	934
SLP05	93
SLP10	988
SLP11	936
Diesel	839

Según lo establecido en la norma EN14214 ninguna de las diferentes muestras analizadas se encuentra dentro de los parámetros establecidos por la misma (siendo el intervalo permitido entre 860-900 kg/m<sup>3</sup>).

La alta densidad que presentan las muestras es consecuencia de la presencia del grupo hidroxilo del éster ricinoléico (el cual, en todos los casos conforma más del 85% de los metil esteres de las muestras); al respecto, Benjumea *et al.* (2009) mencionaron que la densidad de los metil esteres aumenta conforme la longitud de la cadena disminuye y aumenta la cantidad de dobles enlaces, además de la presencia del grupo hidroxilo, el cual contribuye también al aumento de esta propiedad. Canoira *et al.* (2010) reportaron una densidad de 924 kg/m<sup>3</sup>, por otro lado Bello y Makanju (2011) reportaron una densidad relativa, calculada a 35°C de 886 kg/m<sup>3</sup>, mientras tanto, Conceição *et al.* (2007) reportaron una densidad de 927.9 kg/m<sup>3</sup>, siendo estos valores muy similares a los obtenidos en la presente investigación.

### 4.5.3 Viscosidad

Se realizó también la medición de viscosidad cinemática para las 12 muestras de biodiesel de ricino, dichas viscosidades pueden observarse en el Cuadro 42.

**Cuadro 42. Viscosidad cinemática de las 12 muestras de biodiesel de ricino.**

<b>Muestra</b>	<b>Viscosidad (mm<sup>2</sup>/s)</b>
Chi02	19.1654976
Mich	44.9309264
EdoMex	24.3244384
C1M2	18.9573184
C1M3	77.205208
C2M4	17.2918848

Continúa...

**Cuadro 42. Continuación.**

C2M6	54.7381184
C2M7	53.7720368
SLP02	17.3732048
SLP05	15.7955968
SLP10	158.2552256
SLP11	18.2774832
Diesel	3.122688

En relación a esta variable, ninguna de las 12 diferentes muestras de biodiesel en estado puro cumple con las especificaciones definidas, tanto en la norma EN 14214 donde se establece un intervalo permitido entre 3.5 y 5.0 mm<sup>2</sup>/s, como en la norma ASTM D445 donde se establece un intervalo entre 1.9 y 6 mm<sup>2</sup>/s. Esto demuestra que el grado de conversión de la reacción de transesterificación no fue eficiente en ningún caso, quedando restos significativos de mono, di y triglicéridos.

Bello y Makanju reportaron un valor de viscosidad cinemática del biodiesel puro de 10.43 mm<sup>2</sup>/s, además menciona que los altos valores obtenidos de viscosidad pudieron ser disminuidos aumentando la relación molar durante la transesterificación. Sin ser suficiente para alcanzar valores dentro de la norma, solamente con la mezcla de diesel-biodiesel se pudieron obtener valores de viscosidad que cumplieran la norma ASTM D445.

Berman *et al.* (2010) reportaron para biodiesel puro (B100) una viscosidad cinemática de 15.17 mm<sup>2</sup>/s; mientras que Canoira *et al.* (2010) reportaron valores entre 14.2 y 16.2, siendo todos los valores anteriores similares a los obtenidos en las muestras de biodiesel de las colectas SLP11, SLP05, SLP02, C1M2 y Chi02.

#### 4.5.4 Viscosidad cinemática de mezclas biodiesel-diesel.

Se llevaron a cabo mezclas de Biodiesel-Diesel, produciendo muestras de Biodiesel B05, B10, B15 y B20, de las cuales fue medida la Viscosidad Cinemática, la cual se muestra en el Cuadro 43.

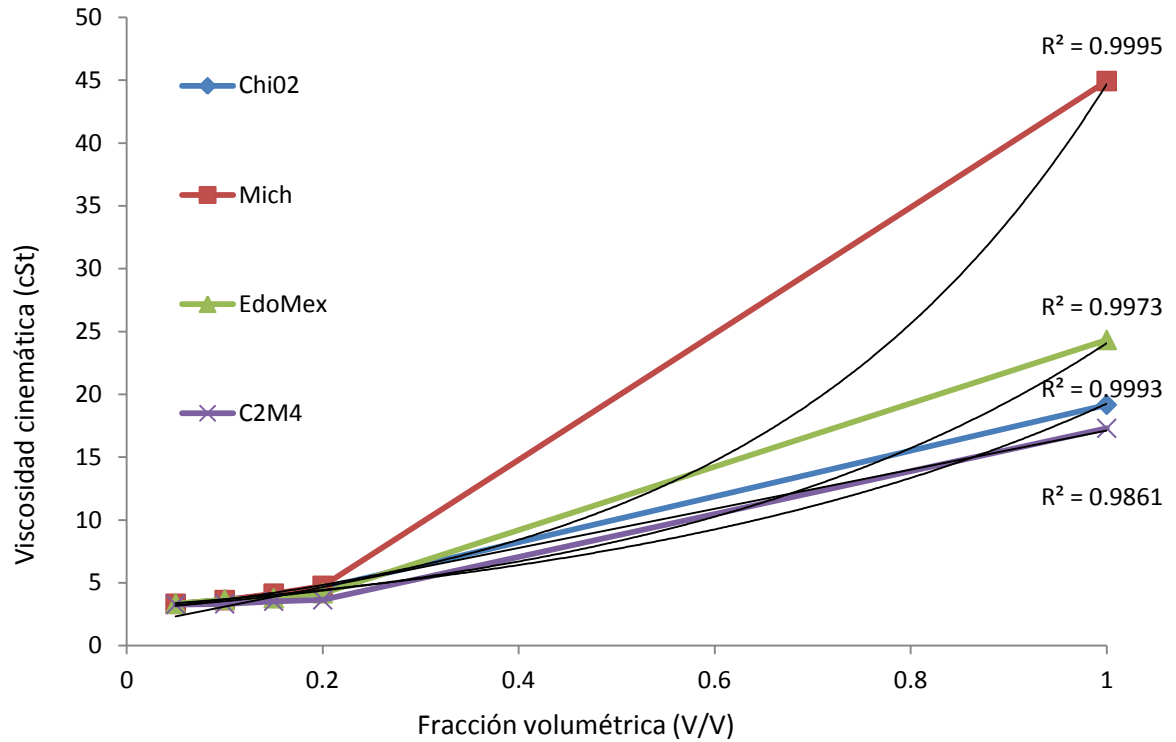
**Cuadro 43. Viscosidad Cinemática de las Mezclas B05, B10, B15 y B20.**

<b>Muestra</b>	<b>B20</b>	<b>B15</b>	<b>B10</b>	<b>B05</b>
Chi02	4.5937753	4.0577823	3.6510582	3.3200037
Mich	4.7482674	4.1271461	3.6163763	3.3200037
EdoMex	4.1649809	3.7645626	3.6542111	3.3294624
C2M4	3.6352937	3.5186364	3.3136979	3.2632515

Para el caso de las diferentes muestras se puede observar, que se cumple con los parámetros establecidos tanto en la Norma EN 14214 como en la ASTM D445 y ASTM D7467 en cualquiera de las diferentes concentraciones.

El comportamiento del aumento de la viscosidad en relación a la concentración de biodiesel no es una relación lineal, pues a medida que se supera el 20% de concentración de biodiesel en las mezclas (fracción volumétrica), la viscosidad aumenta de manera exponencial, lo cual puede observarse en la Figura 76.





**Figura 76. Viscosidad cinemática de las mezclas de biodiesel de ricino a distintas concentraciones.**

Estos valores son resultado de la alta miscibilidad del éster ricinoléico, la cual es prácticamente del 100%; esta propiedad es característica del biodiesel de ricino, lo que le permite disociarse en el diesel de manera estable, lo cual indica que es factible la utilización de biodiesel de ricino mezclado con diesel fósil.

Berman *et al.* (2011) reportaron una viscosidad cinemática de 3.621 del B10 de higuierilla producido en su ensayo, dato muy similar a los obtenidos en el presente trabajo.

El valor de viscosidad cinemática es de suma importancia dentro de la calidad de los biocombustibles, debido a que este determina en gran medida el comportamiento del motor, pues esta característica influye directamente en el

sistema de inyección; particularmente a bajas temperaturas, cuando la viscosidad cinemática es más alta (Atabani *et al.*, 2012).

Las diferentes muestras de biodiesel obtenidas no son aptas para su utilización como biodiesel puro, se podrían presentar problemas dentro del motor debido a los altos valores de viscosidad cinemática que presentan; sin embargo, es posible disminuir dichos valores, sobre todo considerando un proceso de transesterificación más eficiente; por otro lado, se puede observar que las distintas mezclas de biodiesel-diesel, en cualquiera de las diferentes concentraciones, pueden ser utilizadas en motores de combustión interna, debido a que sus valores de viscosidad cinemática se encuentran dentro de los límites establecidos en las diferentes normativas, razón por la cual, el biodiesel de ricino representa una alternativa factible y a corto plazo para la disminución en el consumo de diesel.

#### 4.5.5 Índice de Acidez.

Se midió el índice de acidez para las 12 diferentes muestras de Biodiesel de Ricino, las cuales se muestran en el Cuadro 44.

**Cuadro 44. Índice de acidez de las 12 diferentes muestras de biodiesel puro de ricino.**

<b>Muestra</b>	<b>Peso</b>	<b>Acidez (mg KOH)</b>
Chi02	10.0357	1.04
Mich	10.047	2.44
EdoMex	10.0683	1.56
C1M2	10.0033	0.95
C1M3	10.0822	1.2
C2M4	10.0159	0.81

Continúa...

**Cuadro 44. Continuación.**

C2M6	10.0109	1.05
C2M7	10.0156	1.05
SLP02	10.0216	0.82
SLP05	10.031	1.09
SLP10	10.0191	1.27
SLP11	10.0053	1.21

La Norma EN 14214 exige un contenido máximo de 0.5 mg de KOH para neutralizar los ácidos contenidos en los biodiesel. Por lo tanto se puede observar que el biodiesel de ricino puro, no cumple con la normativa establecida para dicho parámetro. Esto demuestra ineficiencia de la reacción de transesterificación, por lo cual es recomendable (como en el caso de las grasas animales y aceites de cocina) la realización de un proceso de esterificación previa a la transesterificación. En teoría, la acidez de las distintas mezclas tiende a presentar una disminución lineal en relación a la concentración de biodiesel presente en una mezcla con diesel.

Araujo *et al.* (2009) reportaron un valor del índice de acidez de 0.31 mg KOH/g, el cual en comparación a los datos obtenidos es más bajo; esta diferencia puede ser debida a que las pruebas de calidad se realizaron dos meses después de la producción del biodiesel.

Los valores obtenidos de índice de acidez indican que el biodiesel de ricino podría presentar problemas de corrosión, sobre todo en el tanque de depósito y la bomba de diesel, además del motor, por lo cual, las muestras analizadas podrían presentar problemas debido a los resultados obtenidos.

#### 4.5.6 Punto de Obstrucción de Filtro Frio (POFF)

Para el caso del biodiesel puro de ricino no se pudo obtener el POFF debido a que a temperatura ambiente el filtro utilizado durante la prueba se obstruye, esta puede ser causada por la pureza de las mezclas, la formación de compuestos como mono, di o triglicéridos o el alto contenido de glicerina.

Debido a lo anterior se realizó un ensayo con mezclas de Biodiesel B05, B10, B15 y B20, cuyos resultados pueden observarse en la Figura 77.

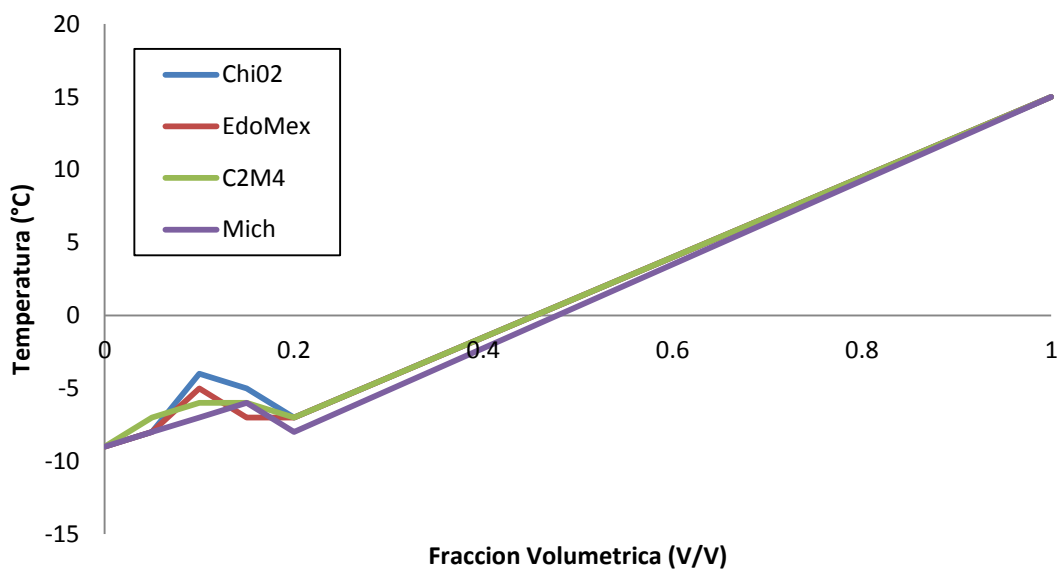


Figura 77. POFF de las diferentes mezclas diesel:biodiesel

En la Figura anterior se observa el comportamiento general del POFF de las mezclas de Biodiesel de Ricino; cabe destacar que las mezclas no tienen un patrón de comportamiento bien definido, debido a que a menor concentración de biodiesel se tiene una medición menor de POFF, pero, a medida que la concentración aumenta, en un inicio el POFF se ve incrementado para posteriormente disminuir de nuevo. En base a lo anterior, el comportamiento

errático del biodiesel de higuera durante la prueba es resultado de la formación de fases una vez que la temperatura comienza a disminuir, razón por la cual las mezclas de B20 tienen un POFF menor a las mezclas B10 y B15 como puede observarse en la Figura 78.

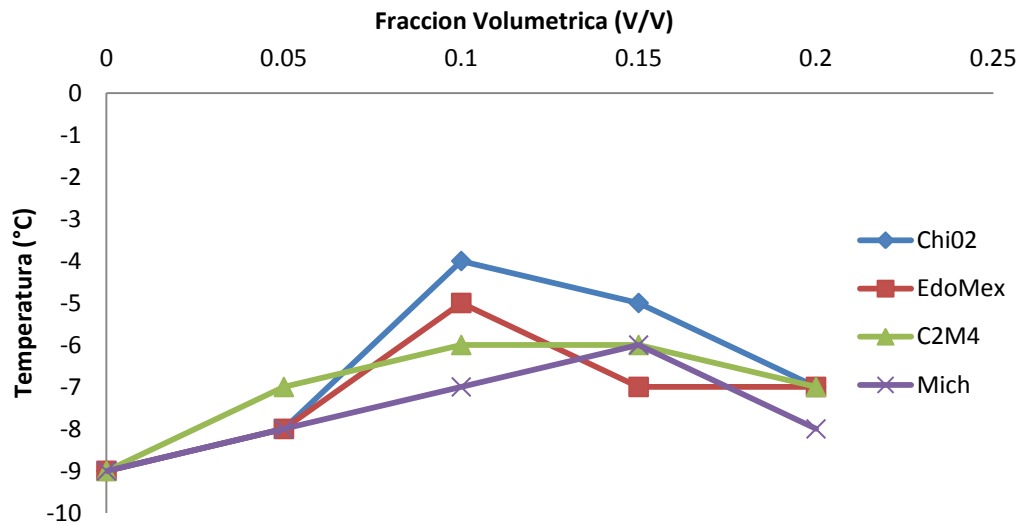
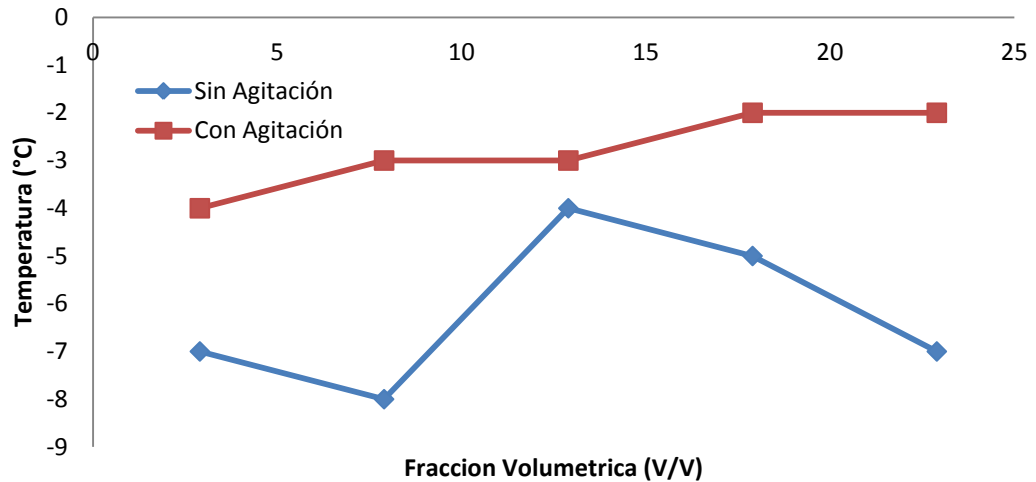


Figura 78. POFF de las mezclas B05, B10, B15 y B20.

Debido a lo anterior, se decidió llevar a cabo una prueba de POFF homogenizando la mezcla, para así conocer el POFF real de la mezcla Diesel-Biodiesel cuyos resultados pueden observarse en la Figura 79.



**Figura 79. Diferencias entre la medición de POFF sin agitación y con agitación.**

En la figura anterior se observa que a medida que se implementa la agitación el POFF registra un aumento constante, debido a que la medición se lleva a cabo con una mezcla homogénea, en tanto que sin agitación, la medida del POFF tiene altibajos debido a que en la mezcla B20 el POFF es principalmente el del diesel como resultado de la separación de fases.

El valor de POFF determina en gran medida el límite inferior de temperatura al cual puede utilizarse un biocombustible, debido a que indica la temperatura a la que los componentes del biodiesel comienzan la cristalización y posterior solidificación (Atabani *et al.*, 2012).

Los datos obtenidos del valor del POFF indican que el biodiesel de ricino no es apto para su utilización en climas fríos, debido a que por debajo de los 0°C la mezcla diesel-biodiesel pierde estabilidad, provocando una separación de fases debido a la cristalización y solidificación del biodiesel de ricino, lo cual pudiera ocasionar problemas en el funcionamiento del motor, principalmente la obstrucción de filtros e inyectores.

#### 4.5.7 Definición de la temperatura mínima de estabilidad de las mezclas de biodiesel.

Debido a que se observó que la mezcla es inestable a bajas temperaturas se decidió determinar la temperatura mínima a la cual la mezcla es aun estable.

El ensayo consistió en el enfriamiento de las muestras iniciando a 2°C y finalizando el ensayo a -4°C para posteriormente ser analizadas por medio del TURBISCAN.

En el caso de las muestras a 2° centígrados, en ningún caso pudo observarse la formación de fases, como puede observarse en la Figura 80.

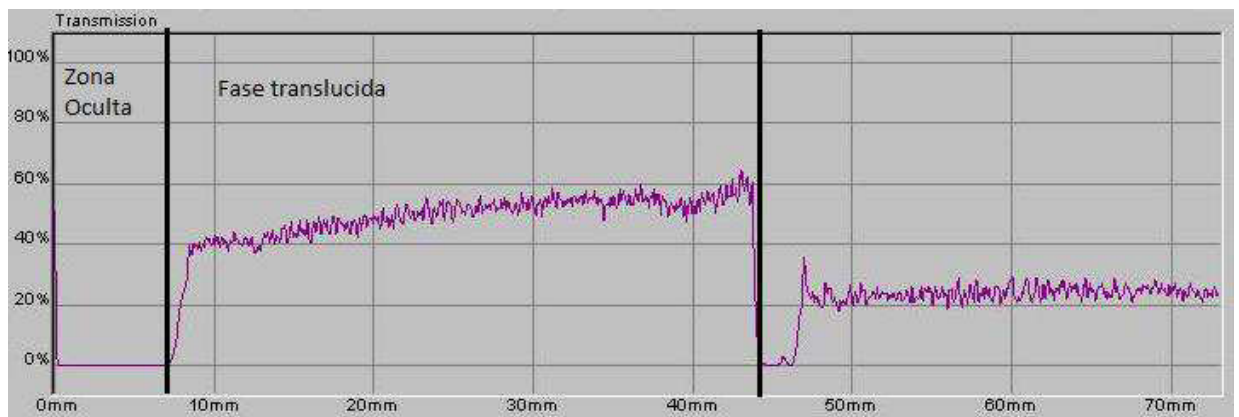
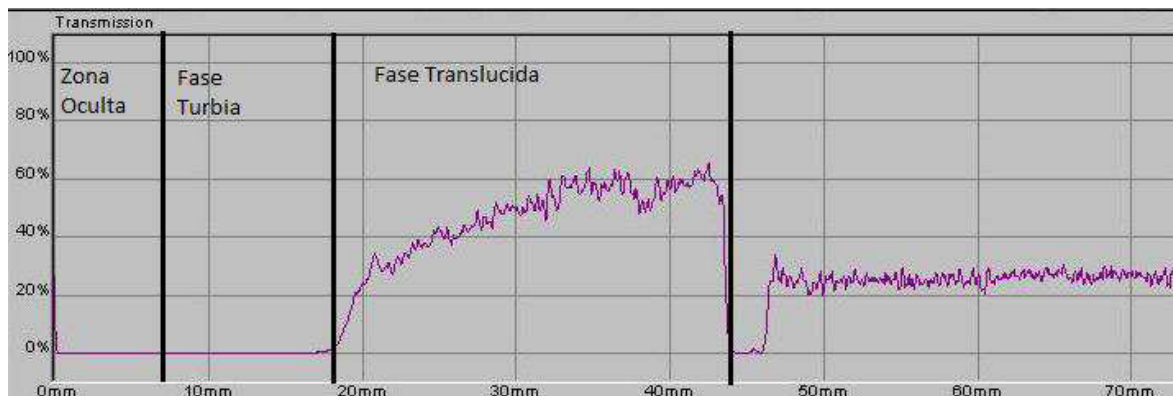


Figura 80. Grafica de transmisión de luz a través de la muestra B05 a 2°C.

En la Figura anterior se observa que la mezcla a esta temperatura es estable, debido a que solo se presenta e una sola fase.

Se estableció que las mezclas elaboradas con Biodiesel de ricino son estables hasta los -4° C, temperatura a la cual se observa una marcada diferenciación de Fases como se observar en la Figura 81.



**Figura 81. Grafica de transmisión de luz a través de la muestra B05 a -4°C.**

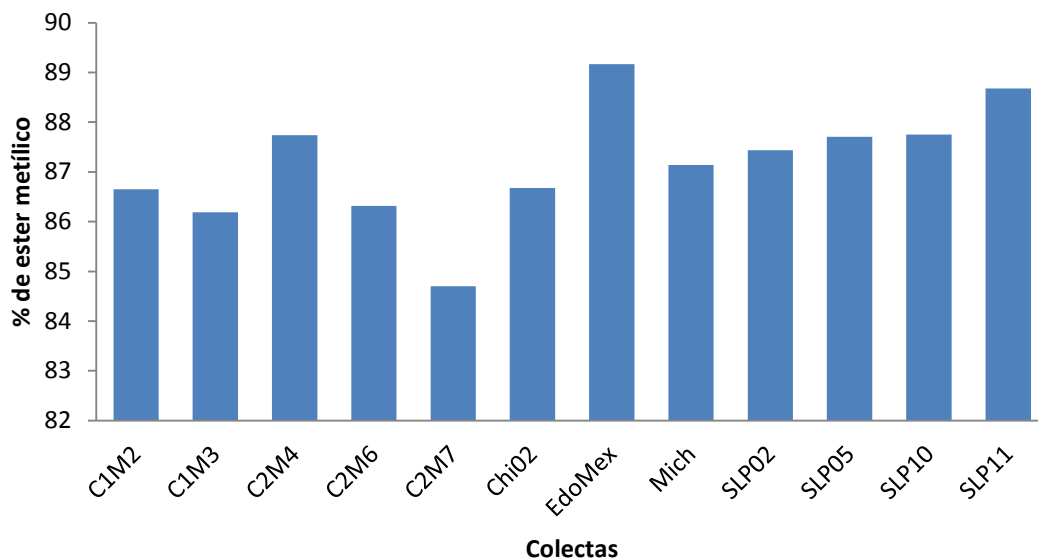
En la Figura 81 se observa la clara formación de fases, en primer plano aparece la fase del biodiesel separado, que, al estar cristalizado se vuelve más opaco a diferencia de la fase compuesta de diesel, la cual sigue permitiendo el paso de la luz a través de la muestra.

Los resultados anteriores indicaron que las diferentes mezclas de biodiesel pueden utilizarse en temperaturas inferiores a 0°C, con un límite de -4°C; debido a esto, las diferentes muestras de biodiesel analizadas pueden utilizarse como combustible durante gran parte del año en la Republica Mexicana.

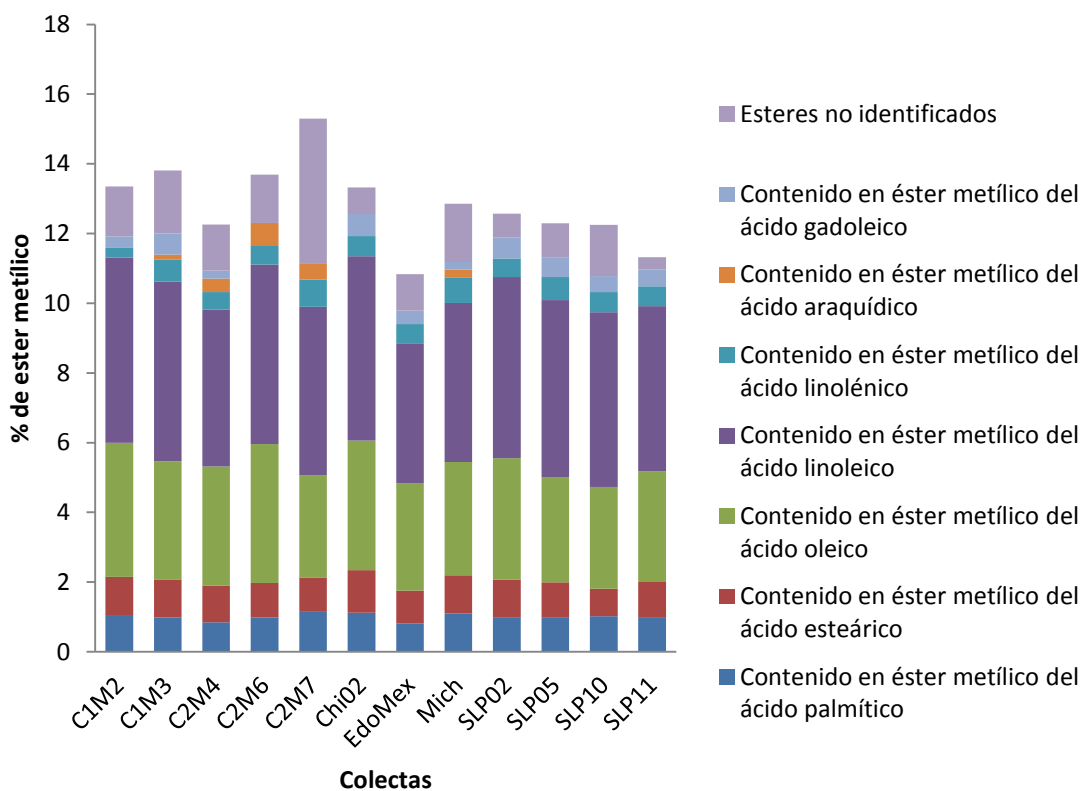
#### **4.5.8 Determinación de FAMES**

Para llevar a cabo la determinación de los diferentes FAME (Fatty Acid Methyl Esters, por sus siglas en inglés) contenidos en el biodiesel, se llevo a cabo una cromatografía de gases, de la cual se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 82 y Figura 83; Anexo 25).





**Figura 82. Porcentaje de éster metílico de ácido ricinoléico contenido en las diferentes muestras de biodiesel.**



**Figura 83. Porcentaje de esteres metílicos contenidos en las diferentes muestras de biodiesel.**

Se observa que existen diferencias entre muestras de biodiesel, por lo cual se realizó un Análisis de Varianza para conocer dicha diferencia, dicho ANAVA, se presenta en el Cuadro 45.

**Cuadro 45. Análisis de varianza del % de FAMES de las diferentes muestras de biodiesel.**

<b>FV</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>F<sub>Cal.</sub></b>	<b>Sig.*</b>
Palmítico	0.231	0.021	5.12	*
Esteárico	0.259	0.024	26.088	**
Oleico	2.818	0.256	43.163	**
Linoléico	3.381	0.307	15.66	**
Linolénico	0.37	0.034	2.514	*
Araquídico	1.102	0.1	2.155	NS
Gadoléico	1.105	0.1	2.741	NS
Ricinoléico	31.026	2.821	3.519	*
Desconocidos	20.412	1.856	3.725	*

Sig.\*=Nivel de Significancia. NS= No significativo

En el cuadro anterior, se observa que las diferencias mayormente significativas entre las muestras de biodiesel se presentan en los porcentajes del contenido de los ácidos esteárico, oléico y linoléico, en tanto que para los porcentajes de los ácidos palmítico, linolénico, ricinoléico muestra una diferencia significativa, mientras que para el ácido araquídico y gadoléico la relación no es significativa.

Bello y Macanju (2011) reportaron que la composición de esteres del biodiesel obtenido fue de un 89.5% de ácido ricinoléico, 4.2% de ácido linoleico, 3% de ácido oleico 1% de ácido esteárico y palmítico, 0.7% de ácido dihidroxiesteárico y 0.3% de ácido gadoléico y linolénico. Por otro lado Conceição *et al.* (2007) reportaron una composición de 90.5% de ácido ricinoléico, 4.4% de ácido linoleico, 2.8% de ácido oleico, 0.9% de ácido esteárico, 0.7% de ácido palmítico, 0.5% de ácido dihidroxiesteárico, 0.3% de ácido licosanoico y 0.2% de ácido linolénico. Martin *et al.* (2010) reportaron que el biodiesel producido presentó una composición de 86% de ácido ricinoléico, 5.5% de ácido linoleico,

3.6% de ácido oleico, 1.3% de ácido palmítico, 1.2% de ácido esteárico y 0.5% de ácido linoleico.

A pesar de mostrar diferencias en la concentración de FAMEs como el ácido palmítico, linoleico, oleico, esteárico, linolénico, araquídico y gadolénico, estas diferencias no implican un cambio marcado en las características del biodiesel, debido a que estas se encuentran determinadas por la concentración del ácido ricinolénico.

Esta composición típica de FAMEs le confiere al biodiesel de higuera tanto características no deseables, como lo son la alta viscosidad y densidad, como deseables, siendo la más importante la alta miscibilidad que presenta este biocombustible.

Los valores obtenidos del análisis de las muestras de las 12 colectas utilizadas coinciden con lo reportado en la literatura, sobre todo respecto a la concentración de ácido ricinolénico, cuyo valor en todos los casos fue superior al 85%; además, la concentración del resto de los ácidos fue muy similar.

Todas las muestras cumplen con la norma EN 14214, la cual establece un límite máximo de 12% m/m de éster de ácido linolénico, pues el valor más alto encontrado fue de 0.86%, presente en la muestra de la colecta C2M7; además, la norma establece también que la cantidad máxima de esteres metílicos poli insaturados (> 4 dobles enlaces) debe ser menor que 1% m/m, las muestras cumplen con la norma debido a que ninguno de los metil esteres presentes en las diferentes muestras posee esta característica.

#### **4.5.9 Densidad Teórica**

Se calculó teóricamente la densidad de las diferentes muestras de biodiesel disponibles, los resultados se presentan en el Cuadro 46 junto con la densidad estimada de forma experimental.

**Cuadro 46. Densidad calculada y densidad experimental de las diferentes muestras de biodiesel de ricino.**

	<b>Densidad 15°C (kg/l)(Experimental)</b>	<b>Densidad 15°C (kg/l)(Calculada)</b>
C1M2	0.948	0.922
C1M3	0.944	0.922
C2M4	0.939	0.922
C2M6	0.939	0.921
C2M7	0.968	0.922
Chi02	0.935	0.921
EdoMex	0.974	0.923
Mich	0.970	0.922
SLP02	0.934	0.922
SLP05	0.930	0.922
SLP10	0.988	0.922
SLP11	0.936	0.922

En este cuadro se observa que la densidad calculada presenta una menor variación con respecto a la experimental, debido principalmente al % de pureza de los diferentes biodiesel de ricino producidos. La densidad calculada, suponiendo una eficiencia del 100% en el proceso de transesterificación tampoco cumple con los límites establecidos por la norma EN14214 (860-900 kg/m<sup>3</sup>), lo cual indica que este tipo de biocombustible solo puede utilizarse en diluciones, debido a la presencia del grupo OH característico del ácido ricinoléico.

El valor de la densidad calculada de manera teórica, sirve como referencia con el fin de conocer el valor de la densidad que puede alcanzarse cuando el proceso de transesterificación se lleva a cabo de manera eficiente; para el caso de las muestras analizadas, se observa que los valores obtenidos de las muestras de las colectas Chi02, SLP02, SLP05 y SLP11 fueron muy similares entre los obtenidos experimentalmente y los calculados, lo cual indica que en estos casos, el proceso de transesterificación se llevo a cabo de manera más eficiente al mostrar datos cercanos a los estimados. En tanto que las muestras de las colectas EdoMex y SLP10 presentaron una marcada diferencia entre los

valores teóricos y los experimentales, lo cual indica que el proceso de transesterificación se llevo a cabo de modo menos eficiente, provocando que el valor de densidad fuera más alto de lo normal.

#### 4.5.10 Índice de Yodo

En base a los cálculos mencionados anteriormente se, obtuvo el Índice de Yodo (expresado en g de yodo/100 g de aceite) de las diferentes muestras de biodiesel; los valores de este índice se presentan en el Cuadro 47.

**Cuadro 47. Índice de Yodo de las 12 muestras de biodiesel de ricino disponibles.**

	<b>IY</b>
C1M2	85.3764318
C1M3	85.7928861
C2M4	84.8990489
C2M6	85.3435173
C2M7	85.6117813
Chi02	85.7113251
EdoMex	84.9663024
Mich	85.2913714
SLP02	85.7672136
SLP05	85.9424654
SLP10	85.9174477
SLP11	85.4461558

Según lo expresado en la Norma EN 14214, todas las muestras de biodiesel analizadas cumplen con la normatividad establecida, la cual no debe sobrepasar 120 g de I<sub>2</sub> por 100 g de aceite.

Este parámetro indica el grado de instauración de la muestra analizada, a mayor IY el aceite o grasa se solidifica a una menor temperatura, además de ser menos estable a la oxidación; como resultado del análisis de las muestras, se observó que el aceite de higuierilla o ricino posee características de estabilidad, además los bajos niveles de este parámetro hacen referencia a la

baja calidad del biodiesel de higuera a bajas temperaturas. Lavanya *et al.* (2012) reportaron índices de yodo que oscilan entre 83.5 y 91 g de I<sub>2</sub> por 100 g de aceite, estos valores fueron obtenidos como resultado del análisis de las 15 mejores variedades disponibles en India, para la producción de biodiesel. Por su parte, Bello y Makanju (2011) reportaron un valor de 80 g de I<sub>2</sub> por 100 g de aceite. Los datos anteriores son consistentes con los obtenidos en la presente investigación, siendo el IY alrededor de 85 g de I<sub>2</sub> por 100 g de aceite de las muestras analizadas.

#### 4.5.11 Peso molecular del aceite, ácidos grasos y biodiesel

Con base a los datos obtenidos en la cromatografía de las diferentes muestras de biodiesel, se calculó el peso molecular del aceite, de los ácidos grasos y del biodiesel de las 12 diferentes muestras, los resultados se muestran en el siguiente Cuadro.

**Cuadro 48. PM (kg/kmol) del aceite, ácido y biodiesel de las 12 muestras disponibles**

<b>Muestra</b>	<b>PM Aceite</b>	<b>PM Acido</b>	<b>PM Biodiesel</b>
C1M2	926.33	296.09	310.12
C1M3	926.64	296.19	310.22
C2M4	927.30	296.41	310.44
C2M6	926.44	296.13	310.15
C2M7	926.48	296.14	310.17
Chi02	926.19	296.04	310.07
EdoMex	927.72	296.55	310.58
Mich	926.71	296.22	310.24
SLP02	926.63	296.19	310.22
SLP05	926.85	296.26	310.29
SLP10	926.96	296.30	310.33
SLP11	927.06	296.33	310.36

El cuadro anterior muestra los diferentes pesos moleculares, los cuales sirvieron para distintos cálculos realizados posteriormente. Se observan también pequeñas variaciones, las cuales, se encuentran ligadas a los porcentajes de FAMEs que constituyen cada uno de los diferentes biocombustibles. Se observa que la gran diferencia que existe entre el peso molecular del aceite con respecto al peso molecular del biodiesel y de los ácidos grasos, se debe principalmente a la separación de la glicerina en el proceso de transesterificación.

#### 4.5.12 Composición atómica del biodiesel

La determinación de la composición atómica se realizó calculando el número de átomos de C, H y O, y además el porcentaje en masa (%m/m) que representa cada uno, la importancia de esta variable reside en que permite conocer la relación carbono – hidrogeno del biocombustible, los resultados se presentan en el Cuadro 49.

**Cuadro 49. Numero de átomos y % m/m de C, H y O que conforman las diferentes muestras de biodiesel.**

Colecta	Átomos			% m/m		
	C	H	O	% C	% H	% O
C1M2	18.983	35.888	2.872	73.517	11.664	14.819
C1M3	18.992	35.895	2.871	73.529	11.663	14.809
C2M4	18.992	35.917	2.883	73.479	11.661	14.860
C2M6	18.990	35.902	2.869	73.536	11.667	14.797
C2M7	18.981	35.878	2.877	73.499	11.659	14.842
Chi02	18.986	35.887	2.867	73.543	11.666	14.792
EdoMex	18.989	35.907	2.896	73.431	11.653	14.916
Mich	18.983	35.889	2.880	73.489	11.660	14.851
SLP02	18.989	35.890	2.874	73.518	11.661	14.821
SLP05	18.988	35.883	2.879	73.497	11.656	14.847
SLP10	18.985	35.878	2.884	73.477	11.653	14.870
SLP11	18.987	35.893	2.884	73.477	11.657	14.866

En el cuadro anterior se observa que el porcentaje de C y H presentan valores usuales en los biocombustibles, los cuales fueron similares a valores reportados por Canoira *et al.* (2010), siendo estos valores de 71.39 y 11.49 de respectivamente.

#### 4.5.13 Calor específico a presión constante.

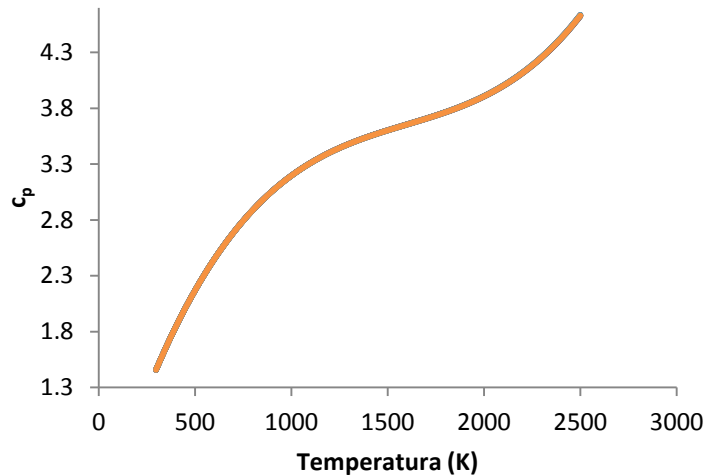
El cálculo del calor específico a presión constante se realizó utilizando el método de Joback, para lo cual se calcularon en primer lugar los coeficientes A, B, C, D y la  $h_f^0$ , los cuales se presentan en el Cuadro 50.

**Cuadro 50. Coeficientes del polinomio que define  $c_p$  y el valor de  $\Delta h_f^0$  para cada una de las diferentes muestras de biodiesel.**

Colecta	A (J/molK)	B (J/molK)	C (J/molK)	D (J/molK)	$h_f^0$ (J/mol)
C1M2	-0.541798	1.807606	-0.001031	$2.149 \cdot 10^{-07}$	-768048.866217
C1M3	-0.630684	1.808557	-0.001032	$2.153 \cdot 10^{-07}$	-767458.310832
C2M4	-0.444153	1.808879	-0.001031	$2.1493 \cdot 10^{-07}$	-770534.703422
C2M6	-0.558500	1.808111	-0.001031	$2.149 \cdot 10^{-07}$	-767618.418003
C2M7	-0.565680	1.807712	-0.001031	$2.151 \cdot 10^{-07}$	-768443.260767
Chi02	-0.621085	1.807807	-0.001031	$2.151 \cdot 10^{-07}$	-766778.167225
EdoMex	-0.414793	1.809043	-0.001031	$2.150 \cdot 10^{-07}$	-772236.439932
Mich	-0.506491	1.807926	-0.001031	$2.149 \cdot 10^{-07}$	-769308.106249
SLP02	-0.614578	1.808358	-0.001031	$2.152 \cdot 10^{-07}$	-767811.408433
SLP05	-0.627414	1.808547	-0.001032	$2.154 \cdot 10^{-07}$	-768396.114531
SLP10	-0.604713	1.808462	-0.001032	$2.154 \cdot 10^{-07}$	-769120.861977
SLP11	-0.528271	1.808521	-0.001031	$2.151 \cdot 10^{-07}$	-769748.477648

Una vez obtenidos los coeficientes anteriores, se procedió al cálculo del valor de  $c_p$  y su desarrollo a diferentes temperaturas (Anexo 26), dichos valores se representan en la Figura 84.





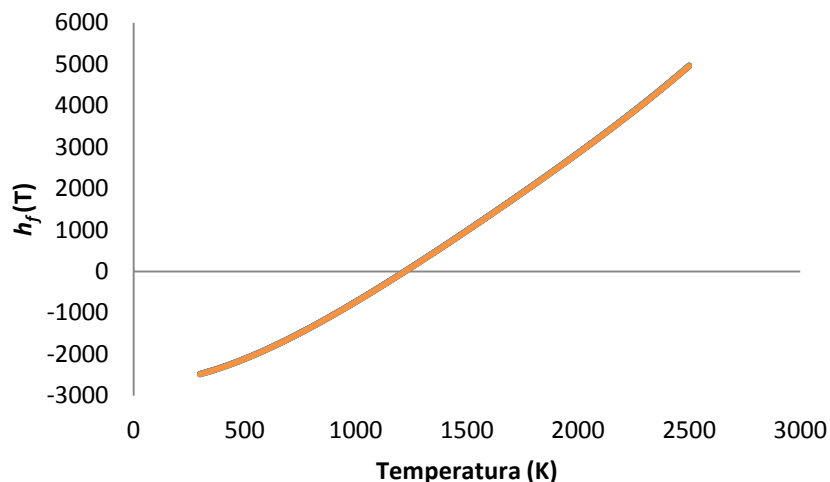
**Figura 84. Desarrollo de  $c_p$  en relación a la temperatura.**

En la figura anterior se graficaron los resultados obtenidos con las 12 diferentes muestras de biodiesel, presentando un comportamiento estadísticamente igual.

En la figura anterior, se observa que a temperaturas altas, propias de la combustión, el calor específico de las muestras en general es menor al calor específico típico del diesel fósil, lo cual indica que el biodiesel de higuera posee una capacidad térmica menor y por lo tanto una tendencia a incrementar su temperatura al existir aportes de calor.

#### 4.5.14 Entalpia de Formación

Para la determinación de la entalpia de formación, se calculó utilizando los coeficientes de Joback, anteriormente mencionados; calculando la entalpia de formación ( $h_f$ ) en función de la temperatura (K), los resultados (Anexo 27) se presentan en la Figura 85.



**Figura 85: Desarrollo de  $h_f$  en relación a la temperatura**

En la figura anterior, se observa como  $h_f$  aumenta con relación a la temperatura.

El cálculo de la entalpía de formación estándar es un parámetro que nos permite conocer la cantidad de calor absorbido o desprendido (teórico) por parte del biodiesel y su evolución con respecto a la temperatura.

Blanquart y Pitsch (2007) mencionaron que la importancia del cálculo de la entalpía de formación reside en que posteriormente, gracias a estos valores, se obtienen diversas variables de la calidad de los biocombustibles relacionadas principalmente con el desempeño del motor y las emisiones de gases.

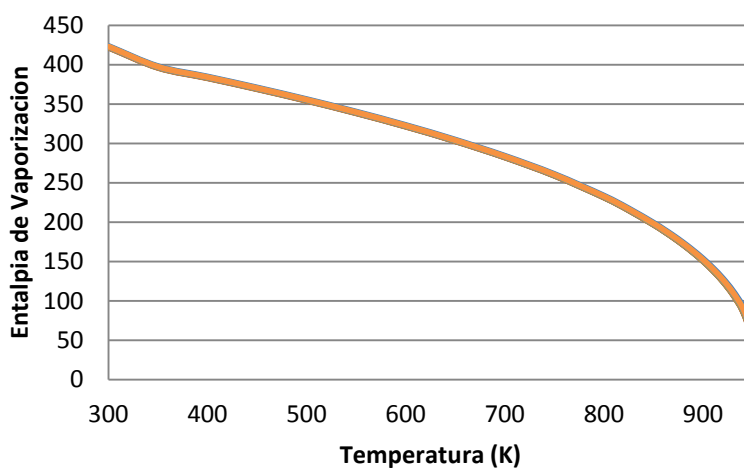
#### **4.5.15 Entalpía de Vaporización**

El cálculo de la entalpía de vaporización se realizó utilizando el método de Joback anteriormente mencionado, en primer lugar se calculó el factor acéntrico crítico, la entalpía de vaporización a temperatura de ebullición y la entalpía de formación estándar, las cuales se concentran en el Cuadro 51, considerando las diferentes muestras de biodiesel disponibles.

**Cuadro 51. Factor acéntrico crítico,  $\Delta h_v(T_e)$  y  $\Delta h_v^0 \left(\frac{kJ}{kg}\right)$  de las 12 diferentes muestras de biodiesel analizadas**

Colecta	$w_c$	$\Delta h_v(T_e)$	$\Delta h_v^0 \left(\frac{kJ}{kg}\right)$
C1M2	1.1169253	245.58116	422.49679
C1M3	1.1166167	245.50324	422.37747
C2M4	1.1193711	245.89322	423.32197
C2M6	1.1159670	245.38605	422.10987
C2M7	1.1178841	245.77744	422.91607
Chi02	1.1155849	245.36350	422.01215
EdoMex	1.1221606	246.37444	424.39141
Mich	1.1185295	245.84453	423.10552
SLP02	1.1171892	245.61211	422.60241
SLP05	1.1184105	245.83123	423.08764
SLP10	1.1194984	246.02688	423.51215
SLP11	1.1194513	245.97397	423.43302

Una vez calculados los datos anteriores, se obtuvo la evolución de la entalpia de vaporización con respecto a la temperatura (Anexo 28), la cual se presenta en la Figura 86.



**Figura 86. Evolución de la  $\Delta h_v^0 \left(\frac{kJ}{kg}\right)$  con respecto a la temperatura.**

En la grafica anterior se observa que la entalpia de vaporización tiende a anularse conforme la temperatura se incrementa, esto se debe a que a medida que la temperatura se aumenta en la combustión, las fases líquida y sólida dejan de coexistir; además, se observa que la anulación de este valor se da a temperaturas más altas que las temperaturas criticas del diesel fósil, por lo tanto, se necesita más energía para transformar el biodiesel en gas que la energía necesaria para transformar el diesel fósil.

Este comportamiento es típico de los biocombustibles, como lo menciona Blázquez (2009) en su investigación en la cual reportó un  $\Delta h_v(T_e)$  para biodiesel de ricino de 245.39, además de que el comportamiento del  $\Delta h_v^0 \left( \frac{kJ}{kg} \right)$  con respecto a la temperatura, se comportó de manera similar al de las 12 muestras de biodiesel analizadas, siendo anulada la entalpia de vaporización después de superados los 900 K.

#### 4.5.16 Poder Calorífico

Se calculó el poder calorífico considerando las diferentes muestras de biodiesel, en el Cuadro 52 se muestran los resultados del Poder Calorífico Inferior a Presión Constante ( $PCI_p$ ) y Poder Calorífico Superior a Volumen Constante ( $PCS_v$ ).

**Cuadro 52.  $PCI_p$  y  $PCS_v$  de las 12 diferentes muestras de biodiesel.**

<b>Colecta</b>	<b><math>PCI_p(kJ/kg)</math></b>	<b><math>PCS_v(kJ/kg)</math></b>
C1M2	35178.8243	37682.3382
C1M3	35183.5886	37686.7865
C2M4	35156.6858	37659.6532
C2M6	35190.8278	37695.0301
C2M7	35165.5767	37668.0493
Chi02	35193.1863	37697.0166

Continúa...

**Cuadro 52. Continuación.**

EdoMex	35125.3911	37626.5784
Mich	35160.8664	37663.5246
SLP02	35176.6902	37679.5521
SLP05	35162.3601	37664.2075
SLP10	35149.5413	37650.7310
SLP11	35152.4404	37654.4320

En el cuadro anterior se observa que tanto del Poder Calorífico Inferior a Presión Constante ( $PCI_p$ ) y el Poder Calorífico Superior a Volumen Constante ( $PCS_v$ ; análogo al cálculo del poder calorífico de modo experimental a través de una bomba calorimétrica) son muy similares entre las diferentes muestras. Esto se debe a que, como se mencionó anteriormente, las muestras están compuestas en mayor medida por el metil éster del ácido ricinoléico, lo cual les confiere a cada una de ellas características similares.

Según la norma europea de biocombustibles EN 14214, el valor mínimo considerado para los biocombustibles es de 35 MJ/kg; en el cuadro anterior, las doce muestras de biodiesel analizadas cumplen con la normativa europea.

Blázquez (2010) reportó un valor teórico de  $PCS_v$  de 37.697 MJ/kg y un valor experimental de 35.8611 MJ/kg; hace mención que la diferencia entre ambos cálculos puede deberse a la presencia de metanol (utilizado durante el proceso de transesterificación) y glicerina, cuya presencia es alta debido a que gracias al alto contenido de ésteres metílicos hidroxilados en el biodiesel presenta una elevada solubilidad en la glicerina, razón por la cual la separación de fases después del proceso de transesterificación se vuelve complicada. Por otro lado, Bello y Makanju (2011) reportaron un valor de 35 MJ/kg.

Los datos anteriores, comparados con los obtenidos de las 12 muestras analizadas mostraron un comportamiento similar a los reportados en la literatura, siendo esta constante en el valor de PCS resultado de la alta concentración de ácido ricinoléico.

Cabe mencionar que estos valores son menores a los del diesel fósil, cuyo valor típico es de 45 MJ/kg (Demirbas, 2007), con lo cual se espera que la potencia del motor se vea disminuida. según Agarwal (2007) el calor de combustión del biodiesel se reduce aproximadamente un 12% debido a la presencia de oxígeno dentro de la molécula, lo cual disminuye el par en alrededor de un 10%; además, esta disminución da como consecuencia un mayor consumo de biodiesel para lograr el mismo desempeño logrado con diesel fósil.

#### 4.5.17 Numero de Cetano

El cálculo del Número de Cetano de las 12 muestras se calculó con base a la metodología antes mencionada; el número de Cetano obtenido se muestra en el Cuadro 53.

**Cuadro 53. Numero de Cetano de las 12 diferentes muestras de biodiesel.**

<b>Colecta</b>	<b>NC</b>
C1M2	60.4099087
C1M3	60.3864591
C2M4	60.5715327
C2M6	60.5395472
C2M7	60.4481221
Chi02	60.3936762
EdoMex	60.4614622
Mich	60.4850602
SLP02	60.3484849
SLP05	60.2997706
SLP10	60.2655711
SLP11	60.3925985

Con base en la norma EN 14214, teóricamente, el biodiesel de higuierilla cumple con la especificación establecida en esta norma, siendo 51.0 el valor mínimo del número de cetano aceptable para los biocombustibles.

El número de cetano es una medida de tendencia de auto combustión de los combustibles, la cual trata de medir la calidad de la ignición de un combustible a través de la medida del tiempo de retraso (tiempo transcurrido entre la inyección del combustible y el comienzo de la combustión), en cuanto menor es el tiempo de retraso mayor es el numero de cetano.

Lo anterior indica que el biodiesel de ricino no presenta (de manera teórica) problemas al momento de la ignición, debido a que el valor de NC es mayor al de los combustibles fósiles, esto se debe a que a cuanto mayor sea la longitud de la cadena de un hidrocarburo no ramificado, mayor será el NC (Lapuerta y Agudelo, 2004).

Además, el NC obtenido del biodiesel de ricino es mayor a la mayoría de los NC reportados de biodiesel de diferentes fuentes vegetales, Ramos *et al.* (2009) reportaron NC de palma (61), oliva (57), girasol (50) y maíz (53), entre otros, donde solo el NC de palma es mayor al obtenido de las doce muestras diferentes de biodiesel analizadas, lo cual indica que es posible utilizar el biodiesel de ricino en motores diesel.

#### 4.5.18 Dosado Estequiométrico

Se calculó en Dosado Relativo de las 12 muestras disponibles de biodiesel, cuyos resultados se observan en el Cuadro 54.

**Cuadro 54. Dosado relativo de las 12 muestras de biodiesel.**

<b>Colecta</b>	$\frac{1}{F_e} \left( \frac{kg_a}{kg_f} \right)$
C1M2	11.8243877
C1M3	11.8255902
C2M4	11.8172375
C2M6	11.8285492

Continúa...

**Cuadro 54. Continuación.**

C2M7	11.8195653
Chi02	11.8289891
EdoMex	11.8063825
Mich	11.8182762
SLP02	11.8232419
SLP05	11.8181176
SLP10	11.8137243
SLP11	11.8152123

El Dosado estequiométrico se refiere a la cantidad estequiométrica de aire necesario en el proceso de combustión, en el cuadro anterior se observa que no existen grandes diferencias en los valores de  $\frac{1}{F_e} \left( \frac{kg_a}{kg_f} \right)$  entre las distintas muestras analizadas, en cambio se observa que el valor de Dosado Relativo obtenido es menor al característico del diesel fósil, esto se debe principalmente a la alta concentración de oxígeno que existe en el biocombustible, lo cual indica que se necesita una menor cantidad de aire para que la reacción sea estequiométrica.



## 5. CONCLUSIONES.

La caracterización molecular dio como resultado la formación de dos grupos diferentes, los cuales, agruparon diferentes colectas de acuerdo con su origen. Por otro lado, la alta sensibilidad de la prueba RAPD pudo haber detectado cambios muy pequeños en el genoma de las diferentes colectas debido a los diferentes procesos de adaptación.

En relación a la caracterización morfológica de la higuera, los diferentes genotipos utilizados mostraron diferencias significativas en la mayoría de las características morfológicas, siendo algunas de estas fácilmente identificadas a simple vista. Se lograron obtener tres grupos estadísticamente diferentes, siendo el grupo dos, integrado por las colectas SLP10, SLP06, Chi02 y C1M6, las cuales pueden utilizarse en una explotación comercial debido a que las características, como altura, dehiscencia y días a floración, son mejores con respecto al resto de grupos identificados.

Para la variable producción de semilla, la cual está ligada a la producción de aceite, se encontró que las colectas más productivas fueron la colecta C1M6 con  $970 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ , Chi02 con una producción de  $937.07 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ , y la colecta SLP06 con  $724.46 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ . La producción de aceite fue en promedio de 46.72% del peso total de la semilla y en cuanto a la producción de biodiesel se obtuvo una relación promedio de aceite: biodiesel de 1:0.84, lo cual permite concluir que las especies de higuera presentes en la República Mexicana tienen un alto potencial para la producción de biodiesel a gran escala.

Finalmente, para la producción de biodiesel y al análisis molecular de la calidad de este, se encontró que, a pesar de las dificultades que existen para la transesterificación del aceite de higuera, este se puede hacer a escala industrial, conociendo la concentración molar del aceite, con el fin de saber la cantidad exacta de catalizador que debe utilizarse, debido a que esta cantidad, en gran parte define la eficiencia del proceso de transesterificación. Además, se

encontró que el biodiesel de higuera pura (B100) no es apropiado para el uso en motores de combustión interna, debido a la alta densidad y viscosidad que presenta, pero es factible su utilización disolviéndolo en diesel, debido a que de esta manera se cumplirían los estándares mínimos necesarios para su utilización en motores de combustión interna.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Afifi A. y Clark V. 1999. Computer-Aided Multivariate Analysis. Tercera Edición, Editorial Chapman y Hall, U.K.
- Agarwal, A.K. 2007. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science* 33 (3): p. 233-271.
- Aimaretti, N.; L. Intilángelo; A. Clementz; J. Ansaldi y J. Yori. 2008. Aprovechamiento de la glicerina obtenida durante la producción de biodiesel. *Invenio*, Junio, Año/Volumen 11, No. 020. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano. Rosario, Argentina. pp 137-144.
- Aliseda R. 2003. Estudio de la Transesterificación de Aceite Vegetal con Metanol. Trabajo Fin de Carrera. Universidad Rey Juan Carlos. España.
- Allan G.; A. Williams; P. Rabinowicz; A. Chan; J. Ravel; P. Keim. 2008. Worldwide genotyping of castor bean germplasm (*Ricinus communis* L.) using AFLPs and SSRs. *Genetic Resource and Crop Evolution*. 55:365-378.
- Alvarez, R. 1994. Estadística multivariante y no paramétrica con SPSS. Aplicación a las ciencias de la salud. Ediciones Díaz de Santos, España.
- Araujo, S.; T. Luna; M. Rola; D. Azevedo y C. Cavalcante. 2009. A rapid method for evaluation of the oxidation stability of castor oil FAME: influence of antioxidant type and concentration. *Fuel Processing Technology*, Vol. 90, pp 1272-1277.
- Arif I.; M. A. Bakir, H. A. Khan, A. Al Farhan, Ali A. A. Homaidan, A. H. Bahkali, M. Al Sadoon y M. Shobrak. 2010. A Brief Review of Molecular Techniques to Assess Plant Diversity. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 11, pp 2079-2096.

- Ashok K.; P.Janila; M. Sujatha y V. Hemalatha. 2009. Inheritance studies on Castor, *Ricinus communis* L. Journal of oilseeds Research. 26(2) pp98-101
- ASTM D1160 - 06. Standard Test Method for Distillation of Petroleum Products at Reduced Pressure.
- ASTM D2709 - 96(2011)e1. Standard Test Method for Water and Sediment in Middle Distillate Fuels by Centrifuge.
- ASTM D445 - 12 Standard Test Method for Kinematic Viscosity of Transparent and Opaque Liquids (and Calculation of Dynamic Viscosity).
- ASTM D86-06. Standard Test Method for Distillation of Petroleum Products at Atmospheric Pressure.
- ASTM D93 - 11 Standard Test Methods for Flash Point by Pensky-Martens Closed Cup Tester.
- Atabani A.; A. Silitonga; I. Badruddin; T. Mahlia; H. Masjuki y S. Mekhilef. 2012. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. Renewable and Sustainable Energy Reviews, Vol. 16, pp 2070-2093.
- Atlas de la agroenergía y los biocombustibles en las Américas: II. Biodiésel. 2010. IICA, Programa Hemisférico en Agroenergía y Biocombustibles – San José, C.R.
- Baldwin B. y Cossar R. 2009. Castor yield in response to planting date at four locations in the south-central United States. Industrial Crops and Products. No.29, pp 316-319.
- Barrera H.; R. Ortiz; A. Rojas y D. Reséndes. 1992. Reacción en cadena de la polimerasa. Una nueva época dorada en la biología molecular. Revista Ciencia y desarrollo (CONACyT) Feb: 50.

- Basappa H. 2007. Validation of integrated pest management modules for castor (*Ricinus communis* L.) in Andhra Pradesh. Indian Journal of Agricultural Sciences. 77(6), pp 357-362.
- Bello E. y A. Makanju. 2011. Production, Characterization and Evaluation of Castor oil Biodiesel as Alternative Fuel for Diesel Engines. Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences. 2(3), pp 525-530.
- Benavides A.; P. Benjumea; V. Pashova. 2007. El Biodiesel de aceite de higuerilla como combustible alternativo para motores diesel. Dyna, Año 74, No. 153, pp 141-150, Medellín, Colombia.
- Benjumea, P., Agudelo, J., Agudelo, A. 2009. Effect of altitude and palm oil biodiesel fuelling on the performance and combustion characteristics of a HSDI diesel engine. Fuel 88 (4): p. 725-731.
- Berman, P.; S. Nizri y Z. Wiesman. Castor oil biodiesel and its blends as alternative fuel. Biomass and Bioenergy. Vol. 35, pp 2861-2866.
- Blanquart, G. y H. Pitsch. 2007. Thermochemical Properties of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) from G3MP2B3 Calculations. Journal of Physical Chemistry A. Vol. 111, pp 6510-6520.
- Camacho V.; L. Soares y M. del Águila. 2007. Evaluación de cuatro cultivares de higuerilla (*Ricinus communis* L.) en la selva del Perú, Región Ucayali. III Congreso Brasileiro de Mamona.
- Canakci, M., Sanli, H. 2008. Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 35 (5): p. 431-441.
- Canoira, L., J. Galeán; R. Alcántara; M. Lapuerta y García-Contreras, R. 2009. Fatty acid methyl esters (FAMES) from castor oil: Production process

assessment and synergistic effects in its properties. *Renewable Energy*. 16, 17, pp 208-217.

Castro, P.; J. Coello y L. Castillo. 2007. Opciones para la producción y uso del biodiesel en el Perú. Perú: Soluciones Prácticas -ITDG. p. 173.

Cavalcante K.; M. Penha, K. Mendonça, H. Louzeiro, A. Vasconcelos, A. Maciel, A. de Souza y F. Silva. 2010. Optimization of transesterification of castor oil with ethanol using a central composite rotatable design (CCRD). *Fuel* 89, pp 1172–1176.

Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable (CEDRS. 2006. Producción de biodiesel a partir de *Jatropha* e higuierilla.

Chan, A.P.; J. Crabtree; Q. Zhao; H. Lorenzi; J. Orvis; D. Puiu; A. Malake-Berhan; K. M. Jones; J. Redman; G. Chen; E. B. Cahoon; M. Gedil; M. Stanke; B. J. Haas; J. R. Wortman; C.M. Fraser-Liggett; J. Ravel; P.D. Rabinowics. 2010. Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*. *Nature Biotechnology*, advance online publication. Nature America Inc.

Conceição, M; V. Fernandes; A. Araujo; M. Farias; I. Santos y A. Souza. Thermal and Oxidative Degradation of Castor Oil Biodiesel. *Energy & Fuels*. 21, pp 1522-1527.

Córdoba O. 2008. Arvenses. En: Higuierilla: Alternativa Productiva, Energética y Agroindustrial para Colombia. Navas A. (Ed.) Centro de Investigación La Selva-CORPOICA. Rionegro Antioquia, Colombia.

Córdoba O. y G. Ríos. Ecofisiología. En: Higuierilla: Alternativa Productiva, Energética y Agroindustrial para Colombia. Navas A. (Ed.) Centro de Investigación La Selva-CORPOICA. Rionegro Antioquia, Colombia.

de Arruda H.; S. Pereira; A. Alves; J. L. Sandes y T. Natel. 2010. Avaliação da diversidade genética entre acessos de mamoneira (*Ricinus communis* L.)

por meio de caracteres morfoagronômicos. Rev. Ceres, Viçosa, v. 57, n.6, p. 773-777.

Demirbas A. 2005. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. Progress in Energy and Combustion Science 31, pp 466–487.

Demirbas, A. 2007. Importance of biodiesel as transportation fuel. Energy Policy 35 (9): p. 4661-4670.

Dourado P.; N. Pouvel; H. Mattana y P. Diogo. 2008. Produção e disponibilidade de nutrientes para mamoneira (*Ricinus communis* L.) adubada com NPK. Revista de Biología e Ciências da Terra. Volume 8- Numero 1, pp 216-223.

Eevera T.; K. Rajendran y S. Saradha. 2009. Biodiesel production process optimization and characterization to assess the suitability of the product for varied environmental conditions. Renewable Energy 34, pp 762–765.

EN 116. 1999. Norma Española. Gasóleos de Automoción y de Calefacción. Determinación del Punto de Obstrucción de Filtros en Frio.

EN 14103. 2003. Norma Española. Productos Derivados de Aceites y Grasas. Esteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME). Determinación de los Contenidos de Ester y de Ester Metílico de Acido Linoleico.

EN 14105. 2003. Norma Española. Productos Derivados de Aceites y Grasas. Esteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME). Determinación de los Contenidos de Glicerol libre y total y de mono-, di- y triglicéridos. Método de Referencia.

EN 14112. 2003. Norma Española. Productos Derivados de Aceites y Grasas. Esteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME). Determinación de la Estabilidad de Oxidación (Ensayo de Oxidación Acelerada).

- EN 14214. 2003. Norma Española. Combustibles de Automoción. Esteres Metílicos de Ácidos Grasos (FAME) para motores Diesel. Requisitos y Métodos de Ensayo.
- FAOSTAT 2010. Revisado el día 3 de Septiembre de 2010. <http://faostat.fao.org/default.aspx>.
- Franco G. 2008. Generalidades del Manejo del Cultivo. En: Higuierilla: Alternativa Productiva, Energética y Agroindustrial para Colombia. Navas A. (Ed.) Centro de Investigación La Selva-CORPOICA. Rionegro Antioquia, Colombia.
- Franco G. y O. Córdoba. 2008. Cosecha y Beneficio de Grano. En: Higuierilla: Alternativa Productiva, Energética y Agroindustrial para Colombia. Navas A. (Ed.) Centro de Investigación La Selva-CORPOICA. Rionegro Antioquia, Colombia.
- Gajera B.; N. Kumar; A. S. Singh; B. S. Punvar; R. Ravikiran; N. Subhash y G.C. Jadej. 2010. Assessment of genetic diversity in castor (*Ricinus communis* L.) using RAPD and ISSR markers. *Industrial Crops and Products* Vol. 32, pp 491–498.
- García-Cota, T. del N. J.; V. M. de la Cruz G., I. Nájera M.; O. Sánchez D.; Y. Reyes O.; T. López A. 2009. Purificación de biodiesel obtenido de aceite de *Ricinus*. *Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales*. México.
- Gonzales E.; J.C. Perea y A.F. López. 2006. Caracterización Termoanalítica de semillas de *Ricinus communis* L. Variedades mamona blanca, mamona negra y silvestre: Análisis de las propiedades reológicas del Biodiesel. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. Universidad de Pamplona, Bucaramanga, Colombia. Vol/año 4, pp15-20.
- Goytia-Jiménez, M.; C. Gallegos-Goytia y C. Núñez-Colín. 2011. Relación entre variables climáticas con la morfología y contenido de aceite en semillas



de Higuierilla (*Ricinus communis* L.) de Chiapas. Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. Vol.17 No.11, pp 41-48.

Guerrero C.A.; I. Osorio y Sierra F. 2010. Evaluación del efecto de la temperatura en la producción de biodiesel con aceite de higuierilla. Ingeniería e Investigación, vol. 30, núm. 2, pp. 52-61.

Jasbeer K, R Son, M Ghazali, Y K Cheah. 2009. Real-time OCR evaluation of seven DNA extraction methods for the purpose of GMO analysis. International Food Research Journal. 16: 329-341.

Joshi H. J.; D.R. Metha y B.S. Jadon. 2002. Heterosis for seed yield and its components, in castor hybrids. Indian J. Agric. Res., 36 (4), pp 264 – 268.

Knothe, G., Krahl, J., Van Gerpen, J. 2005. The biodiesel handbook. USA: AOCS Press.

Koutroubas S.D.; D.K. Papakosta y A. Doitsinis. 1999. Adaptation and yielding ability of castor plant (*Ricinus communis* L.) genotypes in a Mediterranean climate. European Journal of Agronomy, No. 11, pp 227–237.

Lapuerta, M. y J. Agudelo. 2004. Utilización de combustibles alternativos en motores térmicos. Modulo II. Servicio de publicaciones de la E.T.S.I.I. de la Universidad de Castilla-La Mancha.

Lapuerta, M.; J. Rodriguez y E. de Mora. 2009. Correlation for the estimation of the cetane number of biodiesel fuels and implications on the iodine number. Energy Policy. 37, pp 4337-4344.

Lapuerta, M.; J. Rodriguez y O. Armas. 2010. Correlation for the estimation of the density of fatty acid esters fuel and its implications. A proposed Biodiesel Cetane Index. Chemistry and Physics of Lipids 163, pp 720-727.

- Lavanya C.; I.Y.L.N. Murthy; G. Nagaraj y N. Mukta. 2012. Prospects of castor (*Ricinus communis* L.) genotypes for biodiesel production in India. Biomass and Bioenergy. Vol 39, pp 204-209.
- Leal D., E. Jiménez. 2009. Caracterización Morfométrica de cinco ecotipos de higuierilla (*Ricinus communis*) en la ESPOL "Campus Gustavo Galindo".
- Loeza E, M A Gutierrez, D L Ochoa, A Villegas, G Mora, E C Palacios E Pérez. 2011. Análisis de la Resistencia en pomelo y limón mexicano transformados con el gen p25 del Citrus tristeza virus. Agrociencia. 1 Enero- 15 Febrero.
- Londoño M. 2008. Plagas. En: Higuierilla: Alternativa Productiva, Energética y Agroindustrial para Colombia. Navas A. (Ed.) Centro de Investigación La Selva-CORPOICA. Rionegro Antioquia, Colombia.
- Lord M.; L. Roberts y J. Robertus. 1994. Ricin: Structure, mode of action and, some current applications. The FASEB Journal. Vol. 8. Pp 201-208.
- Lozada J. y G. Velásquez. 2009. Transesterificación álcali catalizada del aceite de higuierilla. Revista Investigaciones aplicadas. No.6 Publicada en línea por la Universidad Pontificia Bolivariana. No. 6. pp 1-10.
- Martínez L. 2009. Evaluación de la Biomasa como recurso energético en Cataluña, España. Tesis Doctoral. Universidad de Girona, España. pp 217-229
- Martinez J. y O. Montenegro. 2008. Manejo de Suelos. En: Higuierilla: Alternativa Productiva, Energética y Agroindustrial para Colombia. Navas A. (Ed.) Centro de Investigación La Selva-CORPOICA. Rionegro Antioquia, Colombia.
- Mazzani E. 2007. El Tártago: La planta, su importancia y usos. Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Maracay Venezuela.

- Mazzani E. y E. Rodriguez. 2009. Estudio de la variabilidad presente en germoplasma de tártago (*Ricinus communis* L.) en cuanto a racimos, frutos y semillas. Revista UDO Agrícola Vol 9 (4), pp 764-769.
- Melo W.C.; A.S. dos Santos; L. M. M. Santa Anna; N. Pereira Jr. 2008. Acid and enzymatic hydrolysis of the residue from castor bean (*Ricinus communis* L.) oil extraction for ethanol production: Detoxification and biodiesel process integration. Journal of Brazilian chemistry society. Vol. 19, No.3, pp 418-425.
- Mittelbach, M. y S. Schober. 2003. The influence of antioxidants on the oxidation stability of biodiesel. Journal of the American Oil Chemists Society 80 (8): pp. 817-823.
- Mittelbach, M y C. Remschmidt. 2004. Biodiesel - The comprehensive handbook. Primera Edición.
- Moser, B. 2009. Biodiesel production, properties, and feedstocks. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 45 (3): p. 229-266.
- Navas A. (Ed.). 2008. Higuierilla: Alternativa Productiva, Energética y Agroindustrial para Colombia. Centro de Investigación La Selva-CORPOICA. Rionegro Antioquia, Colombia.
- Navas G. 2008. Fertilización. En: Higuierilla: Alternativa Productiva, Energética y Agroindustrial para Colombia. Navas A. (Ed.) Centro de Investigación La Selva-CORPOICA. Rionegro Antioquia, Colombia.
- Objetivos de Desarrollo del Milenio (Millenium Goals). Revisado el día 3 de Septiembre de 2010. <http://www.un.org/spanish/millenniumgoals/>
- Pallás, V.; C. Escobar; P. Rodríguez y J. Marcos. 2008. Herramientas biotecnológicas en fitopatología. Ed. Mundirensa, España.
- Pasqualino, J. 2006. Cynara Cardunculus as an alternative crop for biodiesel production. Universitat Rovira i Virgili: Tarragona, España.

- Piñero, D.; A. Barahona; L. Eguiarte; A. Rocha y R. Salas. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en *Capital natural de México*, vol. I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. Conabio, México, pp. 415-435.
- Pita R.; A. Anadón y M.R. Martínez. 2004. Ricina: Una fitotoxina de uso potencial como arma. *Revista de Toxicología*. Asociación Española de Toxicología Año/volumen 21, pp 50-63.
- Pitzer, K.; D. Lippman; R. Curl; C. Huggins y Petersen .1955. The Volumetric and Thermodynamic Properties of Fluids. II. Compressibility Factor, Vapor Pressure and Entropy of Vaporization, volume 77. 42
- Poling, B.; J. Prausnitz y J. O'Connell. 2000. *The Properties of Gases and Liquid*. Fifth edition.
- Pradhan S.; C.S. Madankar; P. Mohanty y S.N. Naik. 2012. Optimization of reactive extraction of castor seed to produce biodiesel using response surface methodology. *Fuel* 97, pp 848–855.
- Rada A. y G. Taboada. 1998. Métodos de obtención y purificación de ADN humano para su aplicación en Genética Molecular. *BIOFARBO*, Vol. VI, pp 63-68.
- Ramos, M.; C. Fernández; A. Casas; L. Rodríguez y A. Pérez. 2009. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology*. 100, pp 261-268.
- Raja K. y S. Matcha. 2010. Quantifying nitrogen effects on castor bean (*Ricinus communis* L.) development, growth, and photosynthesis. *Industrial Crops and Products* No. 31, pp 185–191.
- Restrepo F.; G. Salazar y M. Aristizabal. 2010. Alternativas de producción de higuierillo (*Ricinus communis* L.) con fines de extracción de aceites para biodiesel y la industria oleoquímica como estrategia para el

fortalecimiento del Departamento de Caldas. IV Congreso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, João Pessoa. Pp 1-6.

Reid, R.; J. Prausnitz y B. Poling. 1987. The Properties of Gases and Liquid. Fourth edition.

Rutz D. y R. Janssen. 2007. Biofuel Technology Handbook. Publicado por WIP Renewable energies. Múnich, Alemania.

Saldarriaga A. Enfermedades. En: Higuierilla: Alternativa Productiva, Energética y Agroindustrial para Colombia. Navas A. (Ed.) Centro de Investigación La Selva-CORPOICA. Rionegro Antioquia, Colombia.

Samayoa M. 2007. Manual Técnico del Higuierillo. Ministerio de agricultura y ganadería El Salvador C.A. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal, CENTA. Programa Agroindustrial.

Sarwar G.; H. M. Ahmed y J. Hussain. 2010. Evaluation of castorbean (*Ricinus communis* L.) Mutants for genetic parameters and Cluster analysis. Journal of Agricultural Research. 48 (3), pp 289-302.

Shaheen, A.M. 2002. Morphological variation within *Ricinus communis* L. in Egypt; Fruit, Leaf, Seed and Pollen. Pakistan Journal of Biological Science. 5 (11). Pp1202-1208.

Silva L.; O. Alvarado y J.P. Martínez. 1999. La reacción en cadena de la polimerasa como herramienta de diagnóstico en virología vegetal. Fitopatología. Vol. 34, N° 1, pp 13-21.

Soares, L.; M. de Souza. 2005. Curso sobre el cultivo de Higuierilla. Embrapa. Obtenido de la página: <http://www.agronegociosdecolombia.com/documentos%20externos/curso%20para%20cultivar%20higuierilla.pdf>.

- Sujatha M.; T. P. Reddy y M.J. Mahasi. 2008. Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. *Biotechnology Advances* Vol. 26, pp 424–435.
- UNE EN 14110:2003. Derivados de aceites y grasas. Esteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación del contenido de metanol.
- UNE-EN-ISO 12185.1999. Norma Española. Petróleo crudo y productos petrolíferos. Determinación de la densidad. Método del tubo en U oscilante.
- UNE-EN-ISO 12937. 1999. Norma Española. Productos Petrolíferos. Determinación de Agua. Método de Karl Fischer para Valoración Culombimétrica.
- UNE-EN-ISO 3104. 1996. Norma Española. Productos Petrolíferos. Líquidos Transparentes y Opacos. Determinación de la Viscosidad Cinemática y Calcula de la Viscosidad Dinámica.
- UNE-EN-ISO 3675. 1999. Norma Española. Petróleo crudo y productos petrolíferos. Determinación de la Densidad en Laboratorio. Método del Aerómetro.
- UNE-EN-ISO 3679. 2004. Norma Española. Determinación del punto de inflamación. Método del equilibrio rápido en vaso cerrado.
- Valderrama J.; A. Mery y F. Aravena. 1994. La higuera y su principal producto: Aceite de ricino. Parte 1. Aspectos generales. *Información Tecnológica*, Vol. 5, No.1. Santiago de Chile, pp 87-90.
- Valderrama J.; A. Mery y F. Aravena. 1994. Industrialización de la higuera o planta de ricino. Parte II: Extracción de aceite. *Información Tecnológica*, Vol. 5, No.3. Santiago de Chile, pp 91-96.
- Walker J. y R. Rapley. 2008. *Molecular Biomethods Handbook*. Human Press. Totowa N.J.

Williams J.; A. R. Kubelik; K. J. Livak, J. A. Rafalski' y S. V. Tingey. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, No. 22, pp 6531-6535.

## **7. ANEXOS.**



### **A1. Protocolo de extracción de ADN con el Kit Comercial Master Pure Plant**

- 1) Pesar 100 mg de tejido en tubos de 1.5 ml, agregar 300  $\mu$ l de solución para la extracción de DNA, moler con un pistilo.
- 2) Incubar a 70°C por 30 minutos, pasar las muestras a hielo molido por 10 minutos.
- 3) Centrifugar los tubos 5 minutos a 10,000 rpm.
- 4) Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y centrifugar a 10,000 rpm por 5 minutos. Recuperar el sobrenadante.
- 5) Agregar un volumen igual de isopropanol, mezclar por inversión y centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm.
- 6) Desechar el sobrenadante y suspender la pastilla en 100  $\mu$ l de solución Clean-Up, mezclar en Vortex.
- 7) Centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm y desechar el sobrenadante.
- 8) Lavar la pastilla con etanol 70% agregando 100  $\mu$ l para posteriormente centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm desechando el sobrenadante.
- 9) Suspender el ADN en 50  $\mu$ l de T.E.

**A2. Peso molecular de los productos de amplificación (bp), total de productos de amplificación y total de marcadores de los iniciadores OPA01 y OPA02.**

Carril	Colecta	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Total Bandas	Marcadores
2	C1M1	<b>836.32</b>	753.63	<b>500.00</b>					3	2
3	C1M3									
4	C1M6	<b>822.89</b>	753.63	<b>521.57</b>					3	2
5	C2M4	<b>858.10</b>	773.74	<b>521.57</b>					3	2
6	C2M5	800.00	<b>420.02</b>						2	1
7	C2M6									
8	C2M7	836.32	773.74	544.87					3	3
9	Mich									
10	EdoMex									
11	Chi01	<b>810.57</b>	667.16	<b>459.43</b>					3	2
12	Chi02									
13	SLP02									
14	SLP04									
15	SLP05									
16	SLP06	667.16	544.87						2	0
17	SLP09	2176.21	<b>937.30</b>	<b>806.38</b>	<b>600.00</b>				4	3
18	SLP10	<b>836.32</b>	<b>773.74</b>	<b>544.87</b>	<b>338.37</b>				4	4
19	SLP11	890.88	800.00	570.74					3	3
20	C1M1	<b>815.19</b>							1	1
21	C1M3									
22	C1M6	<b>1279.76</b>	<b>789.23</b>	282.83					3	2
23	C2M4	2260.00	<b>1607.33</b>	937.30	<b>810.57</b>				4	2
24	C2M5	1279.76	<b>789.23</b>	<b>282.83</b>					3	2
25	C2M6									
26	C2M7	1710.87	815.19	338.37					3	3
27	Mich									
28	EdoMex									
29	Chi01	2572.26	2089.63	<b>1500.00</b>	<b>806.38</b>				4	2
30	Chi02									
31	SLP02									
32	SLP04									
33	SLP05									
34	SLP06									
35	SLP09	<b>1710.87</b>	937.30	<b>815.19</b>					3	2
36	SLP10	<b>800.00</b>	300.00						2	1
37	SLP11	<b>800.00</b>							1	1

**A3. Peso molecular de los productos de amplificación (bp), total de productos de amplificación y total de marcadores de los iniciadores OPA03 y OPA04.**

Carril	Colecta	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Total Bandas	Marcadores
2	C1M1									
3	C1M3									
4	C1M6	1807.88	<b>533.43</b>	<b>343.27</b>	<b>300.00</b>	<b>200.00</b>			5	4
5	C2M4	<b>400.00</b>	<b>336.76</b>	260.52					3	2
6	C2M5									
7	C2M6	1807.88	1176.01	<b>533.43</b>	<b>350.71</b>	<b>300.00</b>	<b>214.53</b>		6	4
8	C2M7	700.00	<b>419.70</b>	<b>336.76</b>	275.05				4	2
9	Mich	343.27	275.05						2	0
10	EdoMex									
11	Chi01	676.89	<b>419.70</b>	<b>350.71</b>	<b>288.37</b>				4	3
12	Chi02	400.00	330.65						2	0
13	SLP02									
14	SLP04									
15	SLP05									
16	SLP06									
17	SLP09	1807.88	1280.69	<b>600.00</b>	<b>359.58</b>	<b>317.60</b>	<b>245.28</b>		6	4
18	SLP10	1500.00	<b>653.50</b>	<b>400.00</b>	<b>336.76</b>	<b>275.05</b>			5	4
19	SLP11	419.70	<b>336.76</b>	<b>275.05</b>					3	2
20	C1M1									
21	C1M3									
22	C1M6	786.86	<b>653.50</b>	<b>383.71</b>	<b>330.65</b>				4	3
23	C2M4	330.65							1	0
24	C2M5									
25	C2M6	<b>330.65</b>							1	1
26	C2M7	1606.18	<b>400.00</b>	<b>330.65</b>					3	2
27	Mich									
28	EdoMex									
29	Chi01	653.50	<b>383.71</b>	<b>343.27</b>					3	2
30	Chi02									
31	SLP02									
32	SLP04									
33	SLP05									
34	SLP06									
35	SLP09	<b>370.41</b>							1	1
36	SLP10	1280.69	747.22	<b>359.58</b>	<b>317.60</b>				4	2
37	SLP11	317.60							1	0

**A4. Peso molecular de los productos de amplificación (bp), total de productos de amplificación y total de marcadores de los iniciadores OPA05 y OPA06.**

Carril	Colecta	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Total Bandas	Marcadores
2	C1M1									
3	C1M3									
4	C1M6									
5	C2M4	805.68	780.96						2	0
6	C2M5									
7	C2M6									
8	C2M7	2354.13							1	0
9	Mich	2354.13	426.22						2	0
10	EdoMex									
11	Chi01									
12	Chi02									
13	SLP02	797.00	<b>685.39</b>						2	1
14	SLP04	1606.78	1280.35	<b>824.59</b>	<b>780.96</b>	<b>700.00</b>			5	3
15	SLP05	818.10	789.94	617.99					3	0
16	SLP06	808.97	<b>669.67</b>						2	1
17	SLP09	1445.20	1126.82	966.17	<b>818.10</b>	<b>797.00</b>	<b>685.39</b>		6	3
18	SLP10	<b>1227.16</b>	<b>824.59</b>	<b>800.00</b>	<b>700.00</b>				4	4
19	SLP11	1175.79	1000.00	<b>824.59</b>	<b>653.04</b>				4	2
20	C1M1									
21	C1M3									
22	C1M6	<b>1553.88</b>	889.48	824.59	<b>805.68</b>	<b>713.32</b>			5	3
23	C2M4	1553.88	<b>818.10</b>	800.00	685.39				4	1
24	C2M5									
25	C2M6									
26	C2M7	1553.88	<b>824.59</b>	700.00					3	1
27	Mich	<b>1553.88</b>	1175.79	911.24	800.00	713.32			5	1
28	EdoMex	<b>1553.88</b>	889.48	832.81	802.80	<b>713.32</b>			5	2
29	Chi01									
30	Chi02									
31	SLP02	1500.00	<b>1080.82</b>	<b>818.10</b>	700.00				4	2
32	SLP04	1500.00	818.10	797.00	700.00				4	0
33	SLP05									
34	SLP06									
35	SLP09	1500.00	818.10	789.94	<b>685.39</b>				4	1
36	SLP10	808.97							1	0
37	SLP11	1500.00	813.00	669.67					3	0

**A5. Peso molecular de los productos de amplificación (bp), total de productos de amplificación y total de marcadores de los iniciadores OPA07 y OPA08.**

Carril	Colecta	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Total Bandas	Marcadores
2	C1M1									
3	C1M3									
4	C1M6	1345.37	<b>742.68</b>						2	1
5	C2M4	<b>832.74</b>	<b>748.35</b>						2	2
6	C2M5									
7	C2M6	819.77	<b>736.79</b>						2	2
8	C2M7									
9	Mich	742.68							1	0
10	EdoMex									
11	Chi01									
12	Chi02									
13	SLP02	<b>742.68</b>							1	1
14	SLP04	690.40							1	0
15	SLP05	716.65							1	0
16	SLP06									
17	SLP09	<b>723.89</b>							1	1
18	SLP10	<b>708.73</b>							1	1
19	SLP11	<b>723.89</b>							1	1
20	C1M1	753.92	708.73	552.18					3	0
21	C1M3									
22	C1M6									
23	C2M4	<b>589.40</b>	<b>470.94</b>						2	2
24	C2M5	<b>730.57</b>							1	1
25	C2M6									
26	C2M7	<b>589.40</b>							1	1
27	Mich	<b>680.05</b>							1	1
28	EdoMex	736.79	536.50						2	0
29	Chi01									
30	Chi02									
31	SLP02	657.71	<b>486.78</b>						2	1
32	SLP04	1000.00	<b>742.68</b>						2	1
33	SLP05									
34	SLP06									
35	SLP09	<b>748.35</b>							1	1
36	SLP10	690.40	<b>495.31</b>						2	1
37	SLP11	<b>669.10</b>							1	1

**A6. Peso molecular de los productos de amplificación (bp), total de productos de amplificación y total de marcadores de los iniciadores OPA09 y OPA10.**

Carril	Colecta	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Total Bandas	Marcadores
2	C1M1									
3	C1M3									
4	C1M6	959.09	<b>678.501</b>	<b>387.004</b>					3	2
5	C2M4	1197.78	<b>387.004</b>						2	1
6	C2M5									
7	C2M6									
8	C2M7	<b>481.078</b>	317.344						2	1
9	Mich	<b>387.004</b>							1	1
10	EdoMex	723.034	<b>375.055</b>						2	1
11	Chi01									
12	Chi02									
13	SLP02	658.198	375.055						2	0
14	SLP04									
15	SLP05									
16	SLP06									
17	SLP09	<b>375.055</b>							1	1
18	SLP10	<b>462.954</b>	<b>364.01</b>						2	2
19	SLP11									
20	C1M1									
21	C1M3									
22	C1M6	723.034							1	0
23	C2M4									
24	C2M5									
25	C2M6									
26	C2M7									
27	Mich	658.198							1	0
28	EdoMex	658.198							1	0
29	Chi01									
30	Chi02									
31	SLP02									
32	SLP04									
33	SLP05									
34	SLP06									
35	SLP09	678.501							1	0
36	SLP10									
37	SLP11									

**A7. Peso molecular de los productos de amplificación (bp), total de productos de amplificación y total de marcadores de los iniciadores OPA11 y OPA12.**

Carril	Colecta	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Total Bandas	Marcadores
2	C1M1									
3	C1M3									
4	C1M6	<b>515.583</b>	<b>454.172</b>	<b>400</b>					3	2
5	C2M4	515.583	421.288	<b>347.618</b>					3	1
6	C2M5									
7	C2M6									
8	C2M7	<b>426.688</b>							1	1
9	Mich	<b>463.445</b>	<b>289.844</b>						2	2
10	EdoMex	<b>432.49</b>	279.572						2	1
11	Chi01									
12	Chi02	<b>500</b>							1	1
13	SLP02									
14	SLP04									
15	SLP05									
16	SLP06									
17	SLP09	<b>486.173</b>	<b>393.861</b>	<b>300</b>					3	3
18	SLP10	<b>426.688</b>							1	1
19	SLP11									
20	C1M1	1221.961							1	0
21	C1M3									
22	C1M6	<b>416.106</b>							1	1
23	C2M4									
24	C2M5									
25	C2M6									
26	C2M7									
27	Mich	432.49	347.618	<b>269.24</b>					3	1
28	EdoMex	356.298							1	0
29	Chi01									
30	Chi02									
31	SLP02									
32	SLP04									
33	SLP05									
34	SLP06									
35	SLP09	410.954							1	0
36	SLP10									
37	SLP11									

**A8. Peso molecular de los productos de amplificación (bp), total de productos de amplificación y total de marcadores de los iniciadores OPA13 y OPA14.**

Carril	Colecta	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Total Bandas	Marcadores
2	C1M1	2000	1158.033	837.531	731.164	580.716	469.775	410.609	7	0
3	C1M3									
4	C1M6	1692.64	1446.109	518.732	<b>415.954</b>				4	1
5	C2M4	1692.64	1446.109	<b>646.611</b>	469.775	<b>412.691</b>			5	2
6	C2M5	1692.64	1446.109	<b>414.402</b>					3	1
7	C2M6									
8	C2M7	1446.109	<b>646.611</b>	<b>469.775</b>	<b>412.691</b>				4	3
9	Mich	1446.109	<b>483.685</b>	<b>414.402</b>					3	2
10	EdoMex	1446.109	632.558	<b>469.775</b>	<b>412.691</b>				4	2
11	Chi01	1520.852							1	0
12	Chi02									
13	SLP02	1520.852	1329.791	646.611	<b>500</b>	<b>415.954</b>			5	2
14	SLP04	1520.852	1404.06	<b>659.867</b>	<b>500</b>	412.691			5	2
15	SLP05	1520.852	412.691						2	0
16	SLP06	1520.852	1329.791	862.924	646.611	469.775	414.402		6	0
17	SLP09	1520.852	1158.033	<b>646.611</b>	<b>483.685</b>	<b>414.402</b>			5	3
18	SLP10	896.556	<b>632.558</b>	<b>458.057</b>	<b>412.691</b>				4	3
19	SLP11	862.924	632.558	<b>469.775</b>	<b>412.691</b>				4	2
20	C1M1									
21	C1M3									
22	C1M6	1329.791	<b>632.558</b>	433.912	412.691				4	1
23	C2M4	632.558	539.09	428.822	400				4	0
24	C2M5	632.558	458.057						2	0
25	C2M6									
26	C2M7	659.867							1	0
27	Mich	<b>646.611</b>	414.402						2	1
28	EdoMex	1000	<b>646.611</b>						2	1
29	Chi01	1692.64							1	0
30	Chi02									
31	SLP02	632.558	412.691						2	0
32	SLP04	617.193							1	0
33	SLP05									
34	SLP06									
35	SLP09	2000	632.558	448.315	410.609				4	0
36	SLP10	2457.489							1	0
37	SLP11									



**A9. Peso molecular de los productos de amplificación (bp), total de productos de amplificación y total de marcadores de los iniciadores OPA15 y OPA16.**

Carril	Colecta	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Total Bandas	Marcadores
2	C1M1	803.638							1	0
3	C1M3									
4	C1M6	2795.5	2000	<b>805.122</b>	740.586	304.743			5	1
5	C2M4	2161.553	811.102	760.029	327.087				4	0
6	C2M5	2795.5	1900.328	805.122	279.022				4	0
7	C2M6									
8	C2M7	1950.026	803.638	<b>700</b>	584.061	281.971			5	1
9	Mich	2727.976	<b>803.638</b>	<b>700</b>					3	2
10	EdoMex	2661.002	2000	<b>803.638</b>	<b>700</b>	450.721	279.022		6	2
11	Chi01									
12	Chi02									
13	SLP02	2661.002	<b>803.638</b>	<b>700</b>	537.641	279.022			5	2
14	SLP04	2661.002	2105.729	<b>803.638</b>	<b>700</b>	600			5	2
15	SLP05	681.098	400	279.022					3	0
16	SLP06	803.638	681.098	400					3	0
17	SLP09	2661.002	2105.729	<b>803.638</b>	<b>740.586</b>	584.061	290.124		6	2
18	SLP10	700	358.42	279.022					3	0
19	SLP11	2661.002	<b>2105.729</b>	803.638	358.42				4	1
20	C1M1									
21	C1M3									
22	C1M6									
23	C2M4									
24	C2M5									
25	C2M6									
26	C2M7									
27	Mich									
28	EdoMex									
29	Chi01									
30	Chi02									
31	SLP02									
32	SLP04									
33	SLP05									
34	SLP06									
35	SLP09									
36	SLP10									
37	SLP11									

**A10. Peso molecular de los productos de amplificación (bp), total de productos de amplificación y total de marcadores de los iniciadores OPA17 y OPA18.**

Carril	Colecta	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Total Bandas	Marcadores
2	C1M1									
3	C1M3									
4	C1M6	338.693							1	0
5	C2M4									
6	C2M5									
7	C2M6									
8	C2M7									
9	Mich									
10	EdoMex	300							1	0
11	Chi01									
12	Chi02									
13	SLP02									
14	SLP04									
15	SLP05									
16	SLP06									
17	SLP09									
18	SLP10									
19	SLP11									
20	C1M1									
21	C1M3									
22	C1M6	728.939	681.908	438.088	<b>318.745</b>	229.238	156.119		6	1
23	C2M4	874.482	<b>713.306</b>	<b>477.732</b>	253.455				4	2
24	C2M5	774.697	600	438.088	209.01				4	0
25	C2M6									
26	C2M7	874.482	<b>706.875</b>	<b>621.409</b>	<b>550.308</b>	<b>359.269</b>	253.455		6	4
27	Mich	800	<b>700</b>	550.308	<b>379.897</b>	<b>209.01</b>			5	3
28	EdoMex	774.697	<b>706.875</b>	<b>656.268</b>	<b>500</b>	<b>400</b>	<b>229.238</b>		6	5
29	Chi01									
30	Chi02									
31	SLP02									
32	SLP04									
33	SLP05									
34	SLP06									
35	SLP09	929.355	<b>713.306</b>	<b>600</b>	<b>318.745</b>	218.704			5	3
36	SLP10	832.368	<b>621.409</b>	<b>457.343</b>	300	209.01			5	2
37	SLP11	300							1	0

**A11. Peso molecular de los productos de amplificación (bp), total de productos de amplificación y total de marcadores de los iniciadores OPA19 y OPA20.**

Carril	Colecta	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Total Bandas	Marcadores
2	C1M1									
3	C1M3									
4	C1M6									
5	C2M4									
6	C2M5									
7	C2M6									
8	C2M7									
9	Mich									
10	EdoMex	555.528							1	0
11	Chi01									
12	Chi02	1206.059							1	0
13	SLP02									
14	SLP04									
15	SLP05									
16	SLP06									
17	SLP09									
18	SLP10	2748.244	1745.201	<b>1326.51</b>	<b>525.47</b>				4	2
19	SLP11	1093.794							1	0
20	C1M1									
21	C1M3									
22	C1M6	1444.84	784.153						2	0
23	C2M4									
24	C2M5									
25	C2M6									
26	C2M7									
27	Mich									
28	EdoMex	1551.261	784.153						2	0
29	Chi01									
30	Chi02									
31	SLP02									
32	SLP04									
33	SLP05									
34	SLP06									
35	SLP09	724.19							1	0
36	SLP10									
37	SLP11									

**A12. Peso molecular de los productos de amplificación (bp), total de productos de amplificación y total de marcadores de los iniciadores OPG01 y OPG02.**

Carril	Colecta	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Total Bandas	Marcadores
2	C1M1									
3	C1M3									
4	C1M6									
5	C2M4	535.156							1	0
6	C2M5									
7	C2M6									
8	C2M7									
9	Mich									
10	EdoMex									
11	Chi01									
12	Chi02									
13	SLP02									
14	SLP04									
15	SLP05									
16	SLP06									
17	SLP09	662.012							1	0
18	SLP10									
19	SLP11									
20	C1M1									
21	C1M3									
22	C1M6	686.548	600.000						2	0
23	C2M4									
24	C2M5									
25	C2M6									
26	C2M7	1620.827	775.034	<b>638.565</b>	327.161				4	1
27	Mich	760.506	<b>626.473</b>						2	1
28	EdoMex	<b>517.599</b>	<b>400.000</b>						2	2
29	Chi01									
30	Chi02									
31	SLP02									
32	SLP04									
33	SLP05									
34	SLP06									
35	SLP09	729.771							1	0
36	SLP10									
37	SLP11	662.012							1	0

**A13. Peso molecular de los productos de amplificación (bp), total de productos de amplificación y total de marcadores de los iniciadores OPG03 y OPG04.**

Carril	Colecta	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Total Bandas	Marcadores
2	C1M1									
3	C1M3									
4	C1M6	1500.000	<b>571.048</b>						2	1
5	C2M4	700.000	500.000						2	0
6	C2M5									
7	C2M6									
8	C2M7	2057.449	<b>554.867</b>						2	1
9	Mich	2114.118	<b>571.048</b>						2	1
10	EdoMex	1941.712	<b>479.822</b>						2	1
11	Chi01									
12	Chi02									
13	SLP02									
14	SLP04									
15	SLP05									
16	SLP06									
17	SLP09	1760.638	<b>537.604</b>						2	1
18	SLP10	519.301							1	0
19	SLP11									
20	C1M1									
21	C1M3									
22	C1M6	<b>2114.118</b>	<b>841.349</b>	<b>734.090</b>	<b>636.162</b>	<b>571.048</b>			5	5
23	C2M4	2279.868	571.048						2	0
24	C2M5									
25	C2M6									
26	C2M7	1882.473	659.274	571.048	352.223				4	0
27	Mich									
28	EdoMex	2279.868	1882.473	647.566	586.107				4	0
29	Chi01									
30	Chi02									
31	SLP02									
32	SLP04									
33	SLP05									
34	SLP06									
35	SLP09	<b>636.162</b>							1	1
36	SLP10									
37	SLP11									

**A14. Peso molecular de los productos de amplificación (bp), total de productos de amplificación y total de marcadores de los iniciadores OPG05 y OPG06.**

Carril	Colecta	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Total Bandas	Marcadores
2	C1M1									
3	C1M3									
4	C1M6									
5	C2M4									
6	C2M5									
7	C2M6									
8	C2M7									
9	Mich									
10	EdoMex									
11	Chi01									
12	Chi02									
13	SLP02									
14	SLP04									
15	SLP05									
16	SLP06									
17	SLP09									
18	SLP10									
19	SLP11									
20	C1M1									
21	C1M3									
22	C1M6	578.831	<b>391.532</b>						2	1
23	C2M4	718.058	<b>373.738</b>						2	1
24	C2M5	<b>382.786</b>							1	1
25	C2M6									
26	C2M7	518.915	<b>382.786</b>						2	1
27	Mich	561.303	<b>382.786</b>						2	1
28	EdoMex	578.831	<b>382.786</b>						2	1
29	Chi01									
30	Chi02									
31	SLP02									
32	SLP04									
33	SLP05									
34	SLP06									
35	SLP09	561.303	<b>364.365</b>						2	1
36	SLP10									
37	SLP11	513.073	<b>373.738</b>						2	1

**A15. Peso molecular de los productos de amplificación (bp), total de productos de amplificación y total de marcadores de los iniciadores OPG07 y OPG08.**

Carril	Colecta	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Total Bandas	Marcadores
2	C1M1									
3	C1M3									
4	C1M6									
5	C2M4									
6	C2M5									
7	C2M6									
8	C2M7									
9	Mich									
10	EdoMex									
11	Chi01									
12	Chi02									
13	SLP02									
14	SLP04									
15	SLP05									
16	SLP06									
17	SLP09									
18	SLP10									
19	SLP11									
20	C1M1									
21	C1M3									
22	C1M6	656.271	<b>500.000</b>	323.779					3	1
23	C2M4									
24	C2M5									
25	C2M6									
26	C2M7	<b>552.648</b>							1	1
27	Mich	577.222	366.514						2	0
28	EdoMex	<b>552.648</b>							1	1
29	Chi01									
30	Chi02									
31	SLP02	526.749							1	0
32	SLP04									
33	SLP05	1250.338	<b>577.222</b>						2	1
34	SLP06									
35	SLP09									
36	SLP10	671.852							1	0
37	SLP11									

**A16. Peso molecular de los productos de amplificación (bp), total de productos de amplificación y total de marcadores de los iniciadores OPG09 y OPG10.**

Carril	Colecta	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Total Bandas	Marcadores
2	C1M1									
3	C1M3									
4	C1M6									
5	C2M4									
6	C2M5									
7	C2M6									
8	C2M7									
9	Mich	1790.922							1	0
10	EdoMex	<b>1913.849</b>							1	1
11	Chi01									
12	Chi02									
13	SLP02									
14	SLP04									
15	SLP05									
16	SLP06									
17	SLP09									
18	SLP10									
19	SLP11									
20	C1M1									
21	C1M3									
22	C1M6	<b>1616.254</b>	<b>658.236</b>						2	2
23	C2M4									
24	C2M5	<b>800.000</b>	<b>549.800</b>						2	2
25	C2M6									
26	C2M7	1548.334	<b>627.883</b>	<b>400.000</b>					3	2
27	Mich									
28	EdoMex	1439.434	<b>613.392</b>	<b>549.800</b>					3	2
29	Chi01									
30	Chi02									
31	SLP02									
32	SLP04									
33	SLP05									
34	SLP06									
35	SLP09									
36	SLP10	1616.254	<b>541.057</b>	472.458					3	0
37	SLP11									



**A17. Peso molecular de los productos de amplificación (bp), total de productos de amplificación y total de marcadores de los iniciadores OPG11 y OPG12.**

Carril	Colecta	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Total Bandas	Marcadores
2	C1M1	783.493	565.320	512.300	318.790				4	0
3	C1M3	700.000	512.300	323.338					3	0
4	C1M6	2403.459	791.886	<b>623.438</b>	532.402	386.390	331.375		6	1
5	C2M4	2554.968	<b>791.886</b>	649.391	<b>542.073</b>	<b>357.059</b>			5	3
6	C2M5	2316.226	<b>737.692</b>	<b>365.172</b>					3	2
7	C2M6									
8	C2M7	2316.226	791.886	751.487	649.391	<b>532.402</b>	<b>386.390</b>	<b>331.375</b>	7	3
9	Mich	2403.459	791.886	751.487	<b>522.789</b>	331.375			5	1
10	EdoMex	720.679	532.402						2	0
11	Chi01	2482.801	751.487	<b>500.000</b>	350.275				4	1
12	Chi02									
13	SLP02	2316.226	805.077	751.487	<b>565.320</b>	357.059			5	1
14	SLP04									
15	SLP05									
16	SLP06									
17	SLP09	2316.226	771.226	649.391	468.609	<b>350.275</b>			5	1
18	SLP10	2220.383	800.000	675.648	565.320	<b>357.059</b>			5	1
19	SLP11	2115.214	771.226	700.000	<b>565.320</b>	<b>485.253</b>	365.172		6	2
20	C1M1									
21	C1M3									
22	C1M6									
23	C2M4									
24	C2M5									
25	C2M6									
26	C2M7									
27	Mich									
28	EdoMex	649.391	<b>500.000</b>						2	1
29	Chi01									
30	Chi02									
31	SLP02									
32	SLP04	2919.518							1	0
33	SLP05									
34	SLP06									
35	SLP09	675.648	<b>500.000</b>	339.682					3	1
36	SLP10									
37	SLP11	485.253							1	0

**A18. Peso molecular de los productos de amplificación (bp), total de productos y total de marcadores de los iniciadores OPG13 y OPG14.**

Carril	Colecta	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Total Bandas	Marcadores
2	C1M1									
3	C1M3									
4	C1M6									
5	C2M4	667.444	581.872	408.801					3	0
6	C2M5	561.763							1	0
7	C2M6									
8	C2M7	<b>600.000</b>	<b>428.433</b>						2	2
9	Mich	667.444	<b>639.401</b>	<b>439.720</b>					3	2
10	EdoMex	<b>639.401</b>	<b>418.203</b>						2	2
11	Chi01									
12	Chi02									
13	SLP02									
14	SLP04									
15	SLP05									
16	SLP06									
17	SLP09	600.000	<b>418.203</b>						2	1
18	SLP10									
19	SLP11	400.000							1	0
20	C1M1									
21	C1M3									
22	C1M6									
23	C2M4	<b>677.011</b>	<b>439.720</b>						2	2
24	C2M5									
25	C2M6									
26	C2M7	<b>628.313</b>	<b>540.718</b>						2	2
27	Mich	902.373	<b>639.401</b>	<b>418.203</b>	<b>348.143</b>				4	3
28	EdoMex	<b>639.401</b>	<b>428.433</b>	<b>337.814</b>					3	3
29	Chi01	313.940							1	0
30	Chi02									
31	SLP02									
32	SLP04									
33	SLP05									
34	SLP06									
35	SLP09	<b>628.313</b>	439.720	<b>326.479</b>					3	2
36	SLP10	947.637	<b>615.375</b>	452.291	400.000				4	1
37	SLP11	540.718	357.661	300.000					3	0

**A19. Peso molecular de los productos de amplificación (bp), total de productos de amplificación y total de marcadores de los iniciadores OPG15 y OPG16.**

Carril	Colecta	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Total Bandas	Marcadores
2	C1M1									
3	C1M3									
4	C1M6									
5	C2M4									
6	C2M5									
7	C2M6									
8	C2M7									
9	Mich	653.616							1	0
10	EdoMex	<b>667.183</b>	<b>630.392</b>						2	2
11	Chi01									
12	Chi02									
13	SLP02									
14	SLP04									
15	SLP05									
16	SLP06									
17	SLP09	1000.000	<b>620.023</b>	567.616					3	1
18	SLP10									
19	SLP11									
20	C1M1									
21	C1M3									
22	C1M6	800.000	<b>620.023</b>	<b>578.914</b>	<b>466.737</b>				4	3
23	C2M4	933.892	<b>630.392</b>	<b>589.679</b>	<b>500.000</b>				4	3
24	C2M5	589.679	500.000	415.725					3	0
25	C2M6									
26	C2M7	<b>630.392</b>	<b>578.914</b>	<b>529.629</b>					3	3
27	Mich	1189.932	<b>630.392</b>	<b>466.737</b>					3	2
28	EdoMex	<b>630.392</b>	<b>589.679</b>	<b>466.737</b>					3	3
29	Chi01									
30	Chi02									
31	SLP02									
32	SLP04									
33	SLP05									
34	SLP06									
35	SLP09	886.884	<b>567.616</b>	<b>466.737</b>					3	2
36	SLP10									
37	SLP11	630.392							1	0

**A20. Peso molecular de los productos de amplificación (bp), total de productos de amplificación y total de marcadores de los iniciadores OPG17 y OPG18.**

Carril	Colecta	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Total Bandas	Marcadores
2	C1M1									
3	C1M3									
4	C1M6	<b>632.391</b>	<b>365.111</b>	<b>178.750</b>					3	3
5	C2M4	729.355	<b>500.000</b>	<b>350.473</b>					3	2
6	C2M5	<b>523.843</b>	<b>400.000</b>	<b>335.731</b>					3	3
7	C2M6									
8	C2M7	381.125							1	0
9	Mich	<b>789.668</b>	<b>523.843</b>	319.400					3	2
10	EdoMex									
11	Chi01									
12	Chi02									
13	SLP02									
14	SLP04									
15	SLP05									
16	SLP06									
17	SLP09	1597.440	<b>729.355</b>	<b>422.690</b>					3	2
18	SLP10									
19	SLP11	<b>600.000</b>							1	1
20	C1M1									
21	C1M3									
22	C1M6	600.000	422.690						2	0
23	C2M4	1771.138	<b>808.988</b>	<b>632.391</b>	<b>422.690</b>				4	3
24	C2M5	600.000	400.000						2	0
25	C2M6									
26	C2M7	2073.279	<b>800.000</b>	<b>754.189</b>	<b>571.950</b>	<b>400.000</b>			5	4
27	Mich	<b>600.000</b>	422.690						2	1
28	EdoMex	2073.279	<b>789.668</b>	<b>523.843</b>	<b>365.111</b>				4	3
29	Chi01									
30	Chi02									
31	SLP02									
32	SLP04									
33	SLP05									
34	SLP06									
35	SLP09	1597.440	<b>808.988</b>	<b>632.391</b>	<b>448.040</b>				4	3
36	SLP10									
37	SLP11									

**A21. Peso molecular de los productos de amplificación (bp), total de productos de amplificación y total de marcadores de los iniciadores OPG19 y OPG20.**

Carril	Colecta	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Total Bandas	Marcadores
2	C1M1									
3	C1M3									
4	C1M6									
5	C2M4									
6	C2M5									
7	C2M6									
8	C2M7	1302.764	<b>356.834</b>						2	1
9	Mich	1000.000	551.774	<b>365.384</b>					3	1
10	EdoMex	1302.764	525.659	<b>375.176</b>					3	1
11	Chi01									
12	Chi02									
13	SLP02									
14	SLP04									
15	SLP05									
16	SLP06									
17	SLP09	1000.000	<b>375.176</b>	327.495					3	1
18	SLP10									
19	SLP11	1630.126	<b>375.176</b>	327.495					3	1
20	C1M1									
21	C1M3									
22	C1M6									
23	C2M4									
24	C2M5									
25	C2M6									
26	C2M7	365.384							1	0
27	Mich									
28	EdoMex									
29	Chi01									
30	Chi02									
31	SLP02									
32	SLP04									
33	SLP05									
34	SLP06									
35	SLP09									
36	SLP10									
37	SLP11									

**A22. Cuadro de medición de plantas emergidas después de 20 días de latencia.**

Id	Fecha de Medición.							
	18-ene	20-ene	21-ene	24-ene	26-ene	28-ene	31-ene	02-feb
SLP05	0	0	0	0	2	4	9	18
C1M9	0	0	1	9	11	14	24	25
C2M5	4	9	11	22	30	37	52	59
C2M1	27	32	38	47	59	62	65	68
SLP11	0	1	2	3	3	3	8	13
SLP09	7	16	18	34	34	39	46	53
SLP06	0	1	4	15	23	32	41	56
Chi01	7	13	16	30	35	39	42	50
C2M4	0	0	0	0	0	0	0	2
C2M6	0	3	6	8	18	20	33	42
SLP04	0	0	0	0	0	0	0	1
C2M8	0	0	0	0	2	5	8	10
Mich	4	6	6	7	9	11	19	21
SLP08	0	0	0	0	2	3	8	14
C2M7	0	0	0	0	0	0	0	0
SLP10	1	1	1	5	10	11	35	45
EdoMex	0	1	9	19	23	24	40	48
SLP03	0	0	0	0	1	4	5	7
C2M3	0	0	0	0	1	2	5	8
Chi02	6	16	27	39	43	46	62	67
SLP02	14	28	35	42	46	51	63	78
C2M2	0	1	2	2	5	5	6	7

**A23. Cuadro de Producción de Semilla y Aceite de las Diferentes Colectas.**

<b>Colecta</b>	<b>Cosecha 1</b>	<b>Cosecha 2</b>	<b>Cosecha 3</b>	<b>Producción Total de Semilla</b>	<b>Contenido de Aceite w/w</b>	<b>Producción Total de aceite</b>
C1M1	75.3	376.6		451.9	0.5	214.7
C1M3	380.4	52.8		433.2	0.4	181.9
C1M6	36.9	469.1	464.1	970.0	0.4	431.7
C2M1	50.6	301.8		352.4	0.5	158.6
C2M4	93.3	368.3		461.6	0.5	216.9
C2M6	293.8	260.1		553.8	0.5	263.1
C2M7	98.8			98.8	0.5	44.4
Chi01	5.4	115.0	381.7	502.1	0.4	220.9
Chi02	20.3	207.4	709.4	937.1	0.4	393.6
EdoMex	56.3			56.3	0.5	27.0
SLP02	77.1	257.8		334.8	0.5	162.4
SLP03	352.5			352.5	0.5	192.1
SLP04	227.0			227.0	0.5	110.1
SLP05	215.3			215.3	0.5	104.4
SLP06	302.9	421.6		724.5	0.5	365.9
SLP10	632.7			632.7	0.5	284.7
SLP11	479.5	38.8		518.3	0.5	251.4

**A24. Cuadro de promedios, como resultado de la formación de grupos estadísticamente homogéneos utilizando el método de Ward.**

Grupo	Colectas	CT	CH	CN	DF	Altura	#Hojas
1	SLP10, SLP06, Chi02 y C1M6	1.75	1.25	1.75	67.36	37.51	18.27
2	SLP5, SLP04, EdoMex y C2M7	1.75	1.50	2.00	80.53	62.06	20.99
3	SLP03, SLP02, C2M1, Chi01, SLP11, C2M6, C1M3 C2M4 y C1M1	1.33	1.00	1.11	79.03	62.33	29.26

Grupo	Colectas	Largo Semilla	Ancho Semilla	#Cosechas	#Flores	Largo Flor	#Frutos
1	SLP10, SLP06, Chi02 y C1M6	1.005229	0.669596	2.25	2.561408	20.64057	135.4935
2	SLP5, SLP04, EdoMex y C2M7	0.987113	0.618426	1	1.077381	28.04271	90.77083
3	SLP03, SLP02, C2M1, Chi01, SLP11, C2M6, C1M3 C2M4 y C1M1	0.926305	0.606995	2	1.56358	24.27595	83.28091

Grupo	Colectas	Espinosa	Cascara	Dehisente	Producción Semilla	%Aceite	Producción Aceite
1	SLP10, SLP06, Chi02 y C1M6	0.883211	0.500989	0.298214	816.0498	0.455	368.9432
2	SLP5, SLP04, EdoMex y C2M7	0.96875	0.802083	0.645833	149.3281	0.475	71.48977
3	SLP03, SLP02, C2M1, Chi01, SLP11, C2M6, C1M3 C2M4 y C1M1	0.876407	0.729668	0.604574	440.0694	0.471667	206.8871



**A25. % de Metil Esteres (FAMES) y % de pureza de las 12 diferentes muestras de biodiesel.**

PROMEDIOS	C1M2	C1M3	C2M4	C2M6	C2M7	CHD2	EdmMx	Mich	SLP02	SLP05	SLP10	SLP11
% Pureza	80.16	56.91	88.31	82.76	26.13	58.11	72.92	49.58	85.41	86.29	42.52	80.31
Contenido en éster metílico del ácido palmítico	1.05	1.00	0.86	1.00	1.22	1.13	0.82	1.12	1.00	1.00	1.04	0.97
Contenido en éster metílico del ácido esteárico	1.13	1.12	1.07	1.00	1.00	1.22	0.95	1.12	1.08	1.01	0.80	1.08
Contenido en éster metílico del ácido oleico	3.90	3.45	3.46	4.05	3.06	3.75	3.11	3.31	3.52	3.06	2.97	3.19
Contenido en éster metílico del ácido linoléico	5.40	5.25	4.56	5.23	5.05	5.33	4.06	4.64	5.24	5.13	5.09	4.75
Contenido en éster metílico del ácido linoléico	0.27	0.63	0.50	0.55	0.82	0.58	0.56	0.75	0.54	0.67	0.60	0.58
Contenido en éster metílico del ácido araquídico	0.00	0.15	0.39	0.66	0.46	0.00	0.00	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00
Contenido en éster metílico del ácido gadoleico	0.35	0.61	0.24	0.00	0.00	0.64	0.39	0.23	0.61	0.57	0.47	0.49
Contenido en éster metílico del ácido nicotéico	87.90	87.78	88.92	87.50	88.39	87.35	90.11	88.62	88.02	88.56	89.04	88.98

## A26. Valor de $C_p$ y su desarrollo a diferentes temperaturas.

Temp (K)	C1M2	C1M3	C2M4	C2M6	C2M7	Chi02	EdoMex	Mich	SLP02	SLP05	SLP10	SLP11
298.15	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46
300	1.47	1.47	1.47	1.47	1.47	1.47	1.47	1.47	1.47	1.47	1.47	1.47
350	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66
400	1.84	1.84	1.84	1.84	1.84	1.84	1.84	1.84	1.84	1.84	1.84	1.84
450	2.01	2.01	2.01	2.01	2.01	2.01	2.01	2.01	2.01	2.01	2.01	2.01
500	2.17	2.17	2.17	2.17	2.17	2.17	2.17	2.17	2.17	2.17	2.17	2.17
550	2.31	2.31	2.31	2.31	2.31	2.31	2.31	2.31	2.31	2.31	2.31	2.31
600	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45
650	2.57	2.57	2.57	2.57	2.57	2.57	2.57	2.57	2.57	2.57	2.57	2.57
700	2.69	2.69	2.69	2.69	2.69	2.69	2.69	2.69	2.69	2.69	2.69	2.69
750	2.79	2.79	2.79	2.79	2.79	2.79	2.79	2.79	2.79	2.79	2.79	2.79
800	2.89	2.89	2.89	2.89	2.89	2.89	2.89	2.89	2.89	2.89	2.89	2.89
850	2.98	2.98	2.98	2.98	2.98	2.98	2.98	2.98	2.98	2.98	2.98	2.98
900	3.06	3.06	3.06	3.06	3.06	3.06	3.06	3.06	3.06	3.06	3.06	3.06
950	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13
1000	3.20	3.20	3.20	3.20	3.20	3.20	3.19	3.20	3.20	3.20	3.20	3.20
1050	3.26	3.26	3.26	3.26	3.26	3.26	3.25	3.26	3.26	3.26	3.26	3.26
1100	3.31	3.31	3.31	3.31	3.31	3.31	3.31	3.31	3.31	3.31	3.31	3.31
1150	3.36	3.36	3.36	3.36	3.36	3.36	3.36	3.36	3.36	3.36	3.36	3.36
1200	3.40	3.40	3.40	3.41	3.40	3.41	3.40	3.40	3.40	3.40	3.40	3.40
1250	3.45	3.45	3.44	3.45	3.44	3.45	3.44	3.44	3.44	3.44	3.44	3.44
1300	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48
1350	3.52	3.52	3.51	3.52	3.51	3.52	3.51	3.51	3.52	3.51	3.51	3.51
1400	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55	3.54	3.55	3.55	3.55	3.55	3.55
1450	3.58	3.58	3.57	3.58	3.57	3.58	3.57	3.57	3.58	3.57	3.57	3.57
1500	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60
1550	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63	3.63
1600	3.66	3.66	3.65	3.66	3.65	3.66	3.65	3.65	3.66	3.65	3.65	3.65
1650	3.68	3.68	3.68	3.68	3.68	3.68	3.68	3.68	3.68	3.68	3.68	3.68
1700	3.71	3.71	3.71	3.71	3.71	3.71	3.71	3.71	3.71	3.71	3.71	3.71
1750	3.74	3.74	3.73	3.74	3.74	3.74	3.73	3.73	3.74	3.74	3.73	3.73
1800	3.76	3.77	3.76	3.77	3.76	3.77	3.76	3.76	3.77	3.76	3.76	3.76
1850	3.80	3.80	3.79	3.80	3.80	3.80	3.79	3.79	3.80	3.80	3.80	3.79
1900	3.83	3.83	3.83	3.83	3.83	3.83	3.83	3.83	3.83	3.83	3.83	3.83
1950	3.87	3.87	3.86	3.87	3.87	3.87	3.86	3.87	3.87	3.87	3.87	3.87
2000	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	3.90	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91
2050	3.95	3.95	3.95	3.95	3.95	3.95	3.95	3.95	3.95	3.95	3.95	3.95
2100	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
2150	4.06	4.06	4.05	4.06	4.06	4.06	4.05	4.06	4.06	4.06	4.06	4.06

Continúa...

**A26. Continuación.**

---

2200	4.12	4.12	4.11	4.12	4.12	4.12	4.11	4.12	4.12	4.12	4.12	4.12
2250	4.18	4.19	4.18	4.18	4.18	4.19	4.18	4.18	4.19	4.19	4.19	4.18
2300	4.26	4.26	4.25	4.26	4.26	4.26	4.25	4.26	4.26	4.26	4.26	4.26
2350	4.34	4.34	4.33	4.34	4.34	4.34	4.33	4.34	4.34	4.34	4.34	4.34
2400	4.43	4.43	4.42	4.43	4.43	4.43	4.42	4.43	4.43	4.43	4.43	4.43
2450	4.52	4.53	4.52	4.52	4.53	4.53	4.52	4.52	4.53	4.53	4.53	4.52
2500	4.63	4.63	4.62	4.63	4.63	4.63	4.62	4.63	4.63	4.64	4.63	4.63

---

## A27.Valor de $h_f$ en función de la temperatura.

T (K)	C1M2	C1M3	C2M4	C2M6	C2M7	Chi02	EdoMex	Mich	SLP02	SLP05	SLP10	SLP11
298.15	-2476.60	-2473.86	-2482.03	-2474.92	-2477.46	-2472.88	-2486.38	-2479.65	-2475.03	-2476.34	-2478.37	-2480.14
300.00	-2473.89	-2471.16	-2479.33	-2472.21	-2474.76	-2470.17	-2483.68	-2476.95	-2472.33	-2473.63	-2475.67	-2477.44
350.00	-2395.65	-2392.92	-2401.10	-2393.96	-2396.54	-2391.92	-2405.47	-2398.72	-2394.10	-2395.42	-2397.46	-2399.22
400.00	-2308.02	-2305.29	-2313.47	-2306.31	-2308.92	-2304.28	-2317.88	-2311.10	-2306.47	-2307.81	-2309.87	-2311.61
450.00	-2211.62	-2208.90	-2217.09	-2209.90	-2212.54	-2207.88	-2221.53	-2214.72	-2210.09	-2211.45	-2213.52	-2215.25
500.00	-2107.08	-2104.36	-2112.56	-2105.34	-2108.02	-2103.33	-2117.04	-2110.20	-2105.56	-2106.94	-2109.02	-2110.74
550.00	-1994.97	-1992.26	-2000.47	-1993.22	-1995.94	-1991.21	-2004.99	-1998.11	-1993.46	-1994.86	-1996.97	-1998.66
600.00	-1875.86	-1873.15	-1881.37	-1874.08	-1876.85	-1872.08	-1885.94	-1879.02	-1874.36	-1875.79	-1877.91	-1879.59
650.00	-1750.27	-1747.56	-1755.80	-1748.47	-1751.29	-1746.48	-1760.42	-1753.45	-1748.78	-1750.24	-1752.38	-1754.04
700.00	-1618.70	-1616.01	-1624.25	-1616.89	-1619.75	-1614.91	-1628.93	-1621.92	-1617.24	-1618.72	-1620.89	-1622.52
750.00	-1481.65	-1478.96	-1487.22	-1479.82	-1482.74	-1477.84	-1491.96	-1484.90	-1480.20	-1481.72	-1483.91	-1485.52
800.00	-1339.57	-1336.88	-1345.16	-1337.71	-1340.68	-1335.74	-1349.96	-1342.84	-1338.14	-1339.69	-1341.89	-1343.49
850.00	-1192.87	-1190.19	-1198.49	-1190.99	-1194.02	-1189.03	-1203.35	-1196.18	-1191.46	-1193.05	-1195.28	-1196.84
900.00	-1041.97	-1039.30	-1047.61	-1040.06	-1043.16	-1038.12	-1052.54	-1045.31	-1040.58	-1042.20	-1044.46	-1046.00
950.00	-887.24	-884.58	-892.91	-885.30	-888.47	-883.37	-897.90	-890.62	-885.87	-887.53	-889.81	-891.33
1000.00	-729.03	-726.37	-734.73	-727.07	-730.30	-725.14	-739.79	-732.44	-727.68	-729.38	-731.69	-733.18
1050.00	-567.67	-565.01	-573.39	-565.67	-568.97	-563.76	-578.53	-571.11	-566.34	-568.07	-570.41	-571.87
1100.00	-403.44	-400.80	-409.20	-401.42	-404.79	-399.52	-414.41	-406.93	-402.13	-403.91	-406.28	-407.71
1150.00	-236.64	-233.99	-242.42	-234.58	-238.02	-232.69	-247.71	-240.16	-235.35	-237.16	-239.56	-240.97
1200.00	-67.49	-64.85	-73.30	-65.40	-68.91	-63.52	-78.67	-71.05	-66.22	-68.08	-70.50	-71.88
1250.00	103.78	106.42	97.93	105.90	102.32	107.78	92.49	100.18	105.03	103.13	100.68	99.32
1300.00	276.98	279.61	271.09	279.13	275.47	281.00	265.56	273.34	278.21	276.27	273.78	272.45
1350.00	451.93	454.57	446.00	454.11	450.38	455.98	440.40	448.25	453.15	451.17	448.65	447.33
1400.00	628.50	631.14	622.53	630.71	626.91	632.57	616.84	624.77	629.70	627.68	625.13	623.83
1450.00	806.57	809.22	800.55	808.81	804.94	810.67	794.78	802.79	807.76	805.70	803.11	801.83
1500.00	986.04	988.71	979.98	988.33	984.38	990.19	974.13	982.23	987.23	985.13	982.51	981.24
1550.00	1166.87	1169.55	1160.75	1169.18	1165.17	1171.05	1154.82	1163.00	1168.05	1165.91	1163.26	1162.00
1600.00	1349.00	1351.70	1342.83	1351.35	1347.27	1353.22	1336.81	1345.09	1350.19	1348.01	1345.32	1344.07
1650.00	1532.42	1535.15	1526.19	1534.81	1530.66	1536.69	1520.09	1528.47	1533.62	1531.41	1528.69	1527.43
1700.00	1717.16	1719.92	1710.86	1719.58	1715.37	1721.48	1704.68	1713.15	1718.36	1716.12	1713.37	1712.10
1750.00	1903.24	1906.04	1896.87	1905.69	1901.43	1907.61	1890.62	1899.19	1904.47	1902.20	1899.40	1898.13
1800.00	2090.74	2093.59	2084.30	2093.23	2088.91	2095.17	2077.96	2086.64	2091.99	2089.70	2086.87	2085.57
1850.00	2279.74	2282.65	2273.22	2282.27	2277.90	2284.25	2266.81	2275.59	2281.03	2278.71	2275.85	2274.52
1900.00	2470.37	2473.34	2463.76	2472.93	2468.52	2474.95	2457.28	2466.17	2471.70	2469.37	2466.46	2465.10
1950.00	2662.77	2665.82	2656.06	2665.37	2660.91	2667.43	2649.51	2658.51	2664.15	2661.80	2658.86	2657.45
2000.00	2857.11	2860.24	2850.29	2859.74	2855.25	2861.85	2843.67	2852.80	2858.55	2856.19	2853.21	2851.74
2050.00	3053.58	3056.81	3046.65	3056.24	3051.73	3058.42	3039.96	3049.22	3055.09	3052.73	3049.71	3048.17
2100.00	3252.41	3255.75	3245.36	3255.11	3250.57	3257.35	3238.60	3247.99	3254.01	3251.65	3248.59	3246.97

Continúa...

## A27. Continuación.

---

2150.00	3453.84	3457.30	3446.65	3456.57	3452.02	3458.90	3439.84	3449.36	3455.53	3453.18	3450.08	3448.37
2200.00	3658.15	3661.75	3650.82	3660.91	3656.36	3663.33	3643.95	3653.61	3659.95	3657.61	3654.47	3652.65
2250.00	3865.64	3869.39	3858.15	3868.43	3863.89	3870.95	3851.22	3861.04	3867.57	3865.24	3862.07	3860.11
2300.00	4076.63	4080.55	4068.97	4079.46	4074.92	4082.09	4062.00	4071.97	4078.70	4076.40	4073.18	4071.09
2350.00	4291.47	4295.59	4283.63	4294.34	4289.82	4297.09	4276.62	4286.75	4293.70	4291.44	4288.18	4285.93
2400.00	4510.55	4514.87	4502.52	4513.45	4508.97	4516.34	4495.46	4505.77	4512.95	4510.74	4507.43	4505.00
2450.00	4734.26	4738.82	4726.02	4737.19	4732.76	4740.24	4718.93	4729.42	4736.86	4734.70	4731.35	4728.72
2500.00	4963.04	4967.85	4954.58	4966.00	4961.63	4969.23	4947.46	4958.13	4965.86	4963.75	4960.37	4957.52

---

## A28. Evolución de la entalpia de vaporización con respecto a la temperatura.

T (K)	C1M2	C1M3	C2M4	C2M6	C2M7	Chi02	EdoMex	Mich	SLP02	SLP05	SLP10	SLP11
300	421.998941	421.879904	422.824069	421.612337	422.418079	421.514573	423.893045	422.607487	422.104683	422.589736	423.01404	422.934961
350	396.330819	396.213591	397.138533	395.948885	396.745883	395.854949	398.192326	396.929912	396.435365	396.914142	397.332525	397.251703
400	383.14817	383.039677	383.954896	382.776155	383.558783	382.680498	384.994544	383.741814	383.256619	383.729933	384.141774	384.062974
450	369.220918	369.121875	370.028528	368.859021	369.627586	368.761213	371.054991	369.809958	369.333975	369.802374	370.207948	370.131205
500	354.426322	354.337605	355.237332	354.074716	354.829764	353.974199	356.252022	355.011941	354.544896	355.009164	355.408901	355.334243
550	338.605024	338.527734	339.422897	338.263834	339.00628	338.159857	340.427915	339.188909	338.730317	339.191593	339.586158	339.5136
600	321.543954	321.479517	322.373601	321.213205	321.944559	321.104735	323.372125	322.128573	321.677606	322.137586	322.528013	322.457549
650	302.947494	302.89783	303.796158	302.627022	303.349799	302.512572	304.79314	303.536586	303.09184	303.553126	303.941072	303.872649
700	282.385335	282.353169	283.264271	282.074597	282.793117	281.951909	284.26778	282.98486	282.543882	283.010666	283.398887	283.332363
750	259.18908	259.17857	260.117101	258.886724	259.608842	258.752106	261.141185	259.809223	259.367509	259.847028	260.240401	260.175454
800	231.474092	231.496868	232.525501	231.170057	231.932739	231.009666	233.63173	232.157037	231.69231	232.215138	232.635787	232.570724
825	215.160987	215.202478	216.280071	214.856039	215.641569	214.68163	217.431435	215.878699	215.401491	215.948418	216.384109	216.318544
850	196.896709	196.96207	198.112629	196.587265	197.409972	196.393345	199.332581	197.665756	197.167729	197.750733	198.209916	198.14305
860	188.880965	188.958033	190.148222	188.568088	189.411983	188.363999	191.405806	189.677753	189.16772	189.770371	190.242648	190.174901
870	180.35539	180.445917	181.684465	180.037667	180.908084	179.821444	182.988189	181.185941	180.660797	181.287459	181.77593	181.706993
880	171.220423	171.326726	172.625397	170.895904	171.800085	170.664908	173.986705	172.092859	171.548387	172.204948	172.7138	172.643252
890	161.34023	161.465489	162.840732	161.006126	161.954278	160.756674	164.275579	162.265917	161.696179	162.390878	162.925975	162.853216
900	150.5213	150.670093	152.146033	150.173422	151.18064	149.900121	153.677709	151.516928	150.913153	151.658083	152.228037	152.152177
910	138.471622	138.650992	140.265356	138.103253	139.193377	137.797652	141.930037	139.563345	138.911712	139.725815	140.344093	140.263725
920	124.713496	124.935343	126.752829	124.3128	125.527192	123.960327	128.61188	125.946318	125.222934	126.138742	126.828416	126.741102
930	108.363718	108.651361	110.800005	107.906486	109.328327	107.477911	112.972617	109.827232	108.984379	110.066435	110.872987	110.773882
940	87.4032915	87.8166512	90.6249141	86.8243118	88.6728881	86.2420535	93.4053574	89.3302578	88.2439881	89.6586066	90.6974577	90.5741954
950	54.1492986	55.0124239	60.1467277	53.0691121	56.558792	51.8767474	64.8415199	57.7774726	55.800824	58.4032564	60.2330295	60.026351

IN ÓTIN IHUAN IN TONALTIN NICAN TZONQÜICA

AQUÍ TERMINAN LOS CAMINOS Y LOS DÍAS