

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

***Búsqueda de fuentes naturales, no usadas como alimento para la
obtención de bioetanol***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Cristina Monserrat Vargas Contreras



México, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Manuel Jiménez Estrada
VOCAL: Aurora Irma Ortegón Ávila
SECRETARIO: Amelia María de Guadalupe Farres González Saravia
1er. SUPLENTE: Norma Angélica Camacho de la Rosa
2° SUPLENTE: Manuel Fernando Rubio Arroyo

LABORATORIO 2-10, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA: DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

SUPERVISOR TÉCNICO: DR. MANUEL FERNANDO RUBIO ARROYO

SUSTENTANTE: CRISTINA MONSERRAT VARGAS CONTRERAS

“Todo el mundo debe ir mejorando sus cualidades mediante el trabajo, las relaciones humanas, el estudio profundo, las discusiones críticas, todo eso es lo que va transformando a la gente”

Ernesto Guevara de la Serna, El Che.

Gracias a mi Universidad Nacional Autónoma de México, a mí amada Facultad de Química y a esta tesis, por brindarme la oportunidad de transformarme y convertirme en una mejor persona.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por ser mi gran amiga y compañera, por todos los sabios consejos que me has brindado a lo largo de mi vida, por entenderme, escucharme y estar conmigo en los momentos más difíciles, por levantarme en cada tropiezo, por ser mi motivación y fuerza para seguir adelante, por que cada triunfo y victoria de ahora en adelante será reflejo de toda la educación que con gran esfuerzo me brindaste, por que como dices mami no pudiste darme mejor herencia que esto, ¡gracias lula por convertirme en la mujer que soy, te quiero con todo mi corazón!

A mi padre por ser el reflejo de la dedicación y la constancia, por demostrarme que cuando uno quiere puede lograrlo, por enseñarme a luchar, lograr mis metas y nunca darme por vencida, por escucharme y apoyarme en todo momento, por ser un gran amigo y una gran motivación en mi vida, por que gracias a todo tu esfuerzo y empeño me brindaste la oportunidad de seguir estudiando y llegar hasta donde estoy, ¡gracias papi por ser un ejemplo, te quiero con todo mi corazón!

A mi hermano por escucharme y apoyarme cuando más lo necesite, por enseñarme que debo disfrutar más de la vida y de las cosas que hago, por que ante todo tú fuiste y serás la razón principal del porque de todo lo que hago, te quiero mucho Omar nunca debes olvidarlo.

A Luz María gracias por todos los consejos que me has dado, me diste y me darás, por apoyarme, escucharme y darme ánimos cuando yo sentía que todo estaba perdido, por creer tanto en mí y demostrarme que puedo ser una excelente persona si me lo propongo y que mejor ejemplo que tú, te quiero mucho tía y nunca podré dejar de agradecer lo increíblemente genial que has sido conmigo, que dios te bendiga y cuide siempre.

A Alejandra por ser mi fiel cómplice, compañera y súper amiga durante toda la carrera, por compartir tantos momentos a mi lado, escucharme, entenderme y creer en mí, por ser tan excelente persona conmigo y enseñarme a no darme por vencida tan fácilmente, por que estuviste en uno de los momentos mas difíciles de mi vida apoyándome y dándome ánimos para seguir adelante, alecita te quiero mucho y nunca olvides que cuando te duela mirar hacia atrás y te de miedo mirar hacia delante, mira hacia la izquierda o la derecha y allí estaré, a tu lado. ¡Gracias amiga!

A Armando por escucharme, motivarme, apoyarme, creer tanto en mi y amarme por sobre todas las cosas, pero sobre todo por nunca dejarme sola, por que e aprendido a ver las cosas de una manera diferente a tu lado y me has demostrado que cuando uno quiere puede lograrlo, ¡gracias por compartir tantos momentos hermosos a mi lado, no los cambiara por nada del mundo Te amo!

A Paulette, Rocío y Tanybeth por hacer de mi paso por la facultad algo genial y extraordinario, por compartir momentos buenos y malos, pero sobre todo muchas gracias por brindarme su amistad ¡Las quiero chicas!

A Ada, David, Felipe, Gabriel, Laura, Odin, Pavel y Tania, por que más que mis compañeros de laboratorio se convirtieron en mis amigos, eh hicieron de mi estancia en el instituto algo genial y divertido, ¡Gracias!

Al Dr. Manuel Jiménez Estrada por todo el apoyo, la paciencia y confianza brindado, por la oportunidad de realizar mi tesis en un proyecto interesante y por transmitirme el entusiasmo de querer hacer cosas diferentes que se vean reflejadas en el cambio de nuestro país, pero sobre todo por mostrarme un concepto diferente de ciencia, ¡Gracias Doctor!.

Al Dr. Manuel Fernando Rubio Arroyo por brindarnos apoyo al Dr. Jiménez y a mí, por asesorarme y siempre estar pendiente de cómo iba avanzando el proyecto, por todas las aportaciones brindadas, las cuales fueron de gran ayuda, por todo esto y más es que me permito agradecer haya formado parte de este equipo.

A CONACYT Proyecto 83462 por el apoyo y los recursos brindados siendo estos de gran ayuda para el término de la presente tesis.

INDICE

I)	Resumen	4
II)	Introducción	5
III)	Antecedentes	
	1) Biocombustibles	6
	2) Origen del etanol	8
	3) Bioetanol	9
	4) Obtención de etanol	10
	5) Producción de bioetanol en México	11
	6) Tecnología de la fermentación	13
	7) Principios del crecimiento microbiano	13
	8) Medios para procesos de fermentación	16
	9) Fermentación Alcohólica	17
	10) Antecedentes de <i>Pittocaulon praecoex</i>	18
IV)	Justificación	19
V)	Objetivos	
	1) Objetivo General	20
	2) Objetivos Particulares	20
VI)	Materiales y Métodos	
	1) Metodología general	21
	2) Diagrama de proceso	22
	3) Tabla de corrientes	23
	4) Recolección de material vegetal.....	24
	5) Obtención de los extractos acuosos sin hidrolizar de los tallos de <i>Pittocaulon praecoex</i>	
	a) Tallos cortados en trozos	24

b) Tallos molidos	24
c) Tallos cocidos	25
d) Tallos molidos y cocidos	25
6) Obtención de los extractos acuosos por hidrólisis ácida ...	25
7) Liofilización de los extractos hidrolizados	26
8) Métodos de identificación de azúcares	
a) Cromatografía en Capa Fina (CCF)	26
b) Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	26
9) Métodos de cuantificación de azúcares	
a) HPTLC	27
b) Azúcares reductores por DNS	27
10) Fermentaciones	
a) Metodología general de la fermentación	28
11) Destilación de extractos fermentados	
a) Obtención de bioetanol	29
12) Cuantificación de bioetanol	
a) Por Cromatografía de Gases	30
13) Análisis de datos	30

VII) Resultados y discusión

1) Pérdida de agua en material vegetal recolectado.....	31
2) Cuantificación de azúcares por DNS en los extractos acuosos sin hidrolizar e hidrolizados	33
3) Liofilización.....	36
4) Identificación de azúcares por CCF.....	37
5) Identificación de azúcares por RMN.....	39
6) Cuantificación de azúcares por HPTLC.....	40
7) Fermentaciones	41
8) Destilación de etanol	42

VIII) Conclusiones

IX) Bibliografía	46
X) Anexos	
1) Espectros de RMN	50
2) Curva patrón de HPTLC	51
3) Reactivo DNS	52
4) Curva Patrón DNS	53
XI) Apéndices	
1) Cálculos de pérdida de agua	54
2) Cálculos de rendimiento después de liofilización	54
3) Cálculos de RF	55
4) Concentración de azúcares por HPTLC	56

Índice de figuras

Figura 1. Varios procesos de producción de bioetanol	11
Figura 2. Procesos generales de biotecnología	13
Figura 3. Características de crecimiento en un cultivo batch	15
Imagen 1. Equipo de fermentación	28
Imagen 2. Equipo de destilación	29
Imagen 3, 4 y 5. Deshidratación de <i>P. praecoex</i>	31
Gráfica 1. Porcentaje de agua que perdió <i>P. praecoex</i>	32
Gráfica 2. Desviación estándar de Azúcares reductores s/h e h	34
Gráfica 3. Cuantificación de azúcares	40
Gráfica 4. Porcentaje volumen/volumen de etanol	42
Gráfica 8. Desviación estándar del %v/v de etanol del destilado	43
Tabla 2. Porcentaje de agua perdida	31
Tabla 3. Concentración de azúcares reductores	33
Tabla 4. Rendimiento de etanol	41
Tabla 5. Porcentaje de etanol	41
Tabla 6. Porcentaje de etanol y volumen destilado	42

I) RESUMEN

Las plantas son una fuente casi ilimitada de metabolitos, algunos de los cuales son considerados como secundarios. La vasta diversidad de estructuras químicas ha permitido desarrollar oportunidades de negocios sustentables mediante su explotación económica racional [Rocha, 2008]

El objetivo de utilizar una planta de la cual se tiene muy poca información es alentar el estudio de la misma, así como buscar el uso de otros recursos naturales que están simplemente desperdiciados a lo largo y ancho del País. En la actualidad la principal prioridad es buscar nuevas fuentes naturales que sean capaces de resolver las diferentes necesidades, por ejemplo, la obtención de biocombustibles a partir de fuentes naturales ricas en azúcares, dichas necesidades han ido incrementando conforme aumenta la explotación desmedida de los recursos naturales que son sustentables para los seres vivos que conforman las comunidades biológicas.

En los últimos años se ha observado que el **bioetanol** se perfila como un recurso energético sostenible que puede ofrecer ventajas medioambientales y económicas a largo plazo. Este es uno de los biocombustibles más importantes del siglo XXI ya que utilizando el mismo en combinación con la gasolina se puede generar un elevado poder energético, que a su vez genere una disminución importante en cuanto a emisiones contaminantes que dañen el medio ambiente.

Tomando en cuenta lo anterior se propone el uso con fines energéticos de la planta ***Pitcaulon praecox (cav)***, que no es utilizada como alimento directo de los seres vivos, pero contiene azúcares y que además contiene importantes metabolitos que se han utilizado en otras ramas como la medicina tradicional.

Aprovechando estas fuentes de carbono (azúcares) en la planta, usando diferentes metodologías y con ayuda de una fermentación inducida por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se obtuvo **bioetanol** con un mejor rendimiento en la metodología Palo Loco molido el cual fue de **0.83 g de etanol / g de azúcar**.

II) INTRODUCCIÓN

Un combustible que ha surgido con fuerza en los últimos años es el etanol, también llamado bioetanol cuando se obtiene de desechos agrícolas. El etanol ha ido conquistando cada vez mas mercados, pero sobre todo ha ido ganando la simpatía de un mayor sector de la población del mundo por sus beneficios ambientales, además de que es un recurso renovable. El etanol se puede producir de cualquier materia de origen biológico que contenga azúcar tal como almidón o celulosa. Es un carburante oxigenado y puede emplearse como combustible alternativo en automóviles, en estado puro en los motores especialmente diseñados para ello, o bien mezclado con gasolina, por ejemplo E15, donde es una mezcla de 15% de etanol y 85% de gasolina obtenida a partir del petróleo [Juárez, Vivanco, 2009].

Por esta razón, recientemente ha habido interés creciente en la búsqueda de fuentes naturales que no sean sustentables o necesarias para los seres humanos, ya que para la obtención de bioetanol en algunos países como Brasil o Estados Unidos, emplean alimentos ricos en azúcares como la caña de azúcar, la yuca, el maíz, la remolacha y algunas gramíneas por mencionar algunos. Esto a la larga subsana la escasez de petróleo pero, a su vez, se deriva en una insuficiencia de alimentos, elevando el costo de éstos, lo que causaría un serio problema social [Nigam, *et col.* 2010]

Por ello, la búsqueda de otras fuentes de carbohidratos que permitan obtener etanol por fermentaciones adquiere gran importancia. Así pues, el objetivo es utilizar plantas que tienen pocos usos, son fáciles de reproducir y que están desperdiciadas a lo largo y ancho del país. Este es el caso del ***Pittcaulon praecox (cav)***, de nombre común Palo loco, cuyo contenido de carbohidratos nos ha llevado a proponerla como una fuente para la obtención de bioetanol en México, por lo que en el presente trabajo se reportan los resultados obtenidos al realizar fermentaciones con *Saccharomyces cerevisiae* con los extractos acuosos de los tallos de dicha planta y se propone un desarrollo sustentable con este recurso, pues también son fuente de celulosa.

III) ANTECEDENTES

BIOCOMBUSTIBLES

Existen varios tipos de biocombustibles, a los cuales se les clasifica de acuerdo al insumo o materia prima y a la tecnología empleada para producirlos. Debido a los avances en la tecnología, esta clasificación se realiza por generaciones, dependiendo de la disponibilidad de materia prima, área de estudio y tecnología usada para su obtención [Álvarez, 2009]

Primera generación

Algunos de los insumos son de procedencia agrícola y están conformados por las partes alimenticias de las plantas, las cuales tienen un alto contenido de almidón, azúcares y aceites. Ejemplos de estas materias son, el jugo de la caña de azúcar, granos de maíz, jugo de la remolacha o betabel, aceite de semilla de girasol, aceite de soya, aceite de palma, aceite de semilla de algodón, aceite de coco, aceite de maní o cacahuete, entre otros. También se emplean como insumos a, las grasas animales, grasas y aceites de desecho provenientes de la cocción y elaboración de alimentos, y desperdicios sólidos orgánicos.

Los biocombustibles son producidos empleando tecnología convencional como la fermentación (para azúcares y carbohidratos), trans-esterificación (para los aceites y grasas), y la digestión anaerobia (para los desperdicios orgánicos). De estos procesos se obtiene etanol, metanol y n-butanol (a partir de azúcares), biodiesel (a partir de los aceites), y biogas (mezcla de metano y anhídrido carbónico, también conocidos como gas natural y dióxido de carbono respectivamente, obtenido a partir de los desperdicios orgánicos).

Las ventajas de estos biocombustibles son su facilidad de procesamiento y sus bajas emisiones de gases de efecto invernadero [Álvarez, 2009].

Segunda generación

Los insumos son residuos agrícolas y forestales compuestos principalmente por celulosa. Ejemplos de ellos son, el bagazo de la caña de azúcar, el rastrojo de

maíz (tallo, hojas y olote), paja de trigo, aserrín, hojas y ramas secas de árboles, etcétera.

Los procesos de producción tienen un nivel de complejidad más alto que los de primera generación, y como ejemplos destacan la sacarificación-fermentación y el proceso Fischer-Tropsch. Este último proceso también recibe los nombres de proceso GTL y proceso BTL, cuyas siglas en inglés provienen de “Gas-To-Liquids” y “Biomass-To-Liquids” respectivamente, los cuales consisten en la gasificación del carbón y de la materia lignocelulósica de la biomasa, para después sintetizar algún combustible líquido como el etanol.

Mediante los procesos de segunda generación se fabrica etanol, metanol, gas de síntesis (mezcla de anhídrido carbonoso, mejor conocido como monóxido de carbono, e hidrógeno), biodiesel, 2,5-dimetilfurano (DMF), entre otros.

La ventaja principal en la producción de estos biocombustibles es la inexistencia de desviaciones de alimentos provenientes de la agricultura [Álvarez, 2009].

Tercera generación

Los insumos son vegetales no alimenticios de crecimiento rápido y con una alta densidad energética almacenada en sus componentes químicos, por lo que se les denomina “cultivos energéticos”. Entre estos vegetales están los pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido, y las algas verdes y verde azules.

Los procesos de obtención de biocombustibles se encuentran en fase de desarrollo, sin embargo, se ha logrado producir biodiesel y etanol a nivel planta piloto.

Las ventajas de estos biocombustibles son el secuestro de anhídrido carbónico (CO₂) para la producción de los insumos y un balance positivo en la emisión de gases de efecto invernadero, pero su desventaja es la utilización de tierras de cultivo de alimentos para sembrar los insumos, con excepción de las algas verdes [Álvarez, 2009].

Cuarta generación

Los biocombustibles son producidos a partir de bacterias genéticamente modificadas, las cuales emplean anhídrido carbónico (CO₂) o alguna otra fuente de carbono para la obtención de los biocombustibles.

A diferencia de las generaciones anteriores, en las que también se pueden emplear bacterias y organismos genéticamente modificados como insumo o para realizar alguna parte de los procesos, en la cuarta generación, las bacterias son las que efectúan la totalidad del proceso de producción de los biocombustibles.

Sin duda, los biocombustibles son una transición al futuro en materia energética. Es decir, constituyen una especie de puente entre los hidrocarburos y los energéticos renovables del futuro. Sin embargo, los procesos de incorporación de la producción, transporte, distribución y comercialización de biocombustibles son de muy largo plazo. [Álvarez, 2009]

La introducción de estos combustibles requiere de una estricta voluntad política y la concertación institucional entre los organismos de gobierno resulta vital. La participación y el compromiso del sector privado son fundamentales para el éxito del programa.

Además, la producción de biocombustibles involucra una gran cantidad de mano de obra local, con diversos grados de preparación para cubrir necesidades agrícolas, energéticas, comerciales, tecnológicas, de control de calidad, etcétera [Canizales, 2001].

Al producir biocombustibles, es primordial no establecer una competencia con la producción de alimentos, ya que, debido a las condiciones en que se encuentra en la actualidad el campo, México ya no es autosuficiente en casi ningún tipo de producto agrícola [Musalem, 2006].

ORIGEN DEL ETANOL

El etanol se ha utilizado como combustible para el transporte desde que Henry Ford y otros pioneros del transporte empezaron a desarrollar los automóviles. En los 80's, Ford utilizó el etanol para abastecer de combustible uno de sus primeros

automóviles, un cuatriciclo. La visión de Ford era “construir un vehículo accesible a la familia rural y accionado por un combustible que haría crecer la economía agrícola [Musalem, 2006].

Durante los años 30, del siglo XX, más de dos mil estaciones de gasolina en el Medio Oriente Estadounidense vendían etanol fabricado con maíz; pero la industria del etanol cerró hacia los años 40 con el descenso del precio del petróleo.

Durante la Primera y la Segunda Guerra Mundial en Estados Unidos y Europa, los combustibles de alcohol suplieron las fuentes de combustible a base de aceite. Durante la segunda guerra mundial incluso se cerraron las destilerías de whisky, para producir el combustible a base de alcohol [Musalem, 2006]

BIOETANOL

Al etanol si se produce utilizando una biomasa renovable, se le llama **bioetanol**. La ventaja del uso del bioetanol es que un biocarburente renovable y amigable con el medio ambiente. La producción mundial de bioetanol de primera generación en 2006 fue de cerca de 51 mil millones de litros, un 35% del total. China y la India contribuyeron con 11% de la producción mundial de etanol en 2006, y los niveles de producción eran mucho más bajos que en otros países. Muchos países ahora se están involucrando en la expansión de la producción de etanol, con Estados Unidos y Brasil [Nigam, *et col.*, 2010].

En comparación, un litro de etanol contiene 66% de la energía proporcionada por un litro de gasolina, pero tiene un mayor nivel de octanaje, y cuando se mezcla con gasolina para el transporte mejora el rendimiento de este último [Nigam, *et col.* 2010]. Como por ejemplo: la mezcla E10 (10% de etanol y 90% de gasolina) o la mezcla E85 o en su forma pura [Cabrera *et al.*, 2000].

El etanol también mejora la quema de combustible en los vehículos, reduciendo así la emisión de monóxido de carbono, hidrocarburos sin quemar y carcinógenos. En comparación a la gasolina, el etanol contiene sólo una cantidad mínima de azufre [Nigam, *et col.*, 2010].

Todos los fabricantes de automóviles que comercializan en el mundo aprueban el uso de ciertas mezclas de etanol y gasolina. Las mezclas de etanol como carburante se utilizan con éxito en todos los tipos de vehículos y máquinas que requieren gasolina. [Cabrera *et al.*, 2000].

OBTENCIÓN DE ETANOL

El proceso para producir etanol dependerá mucho del producto que se utilice como materia prima.

Como ya se señaló, el etanol se obtiene mediante la transformación de los azúcares que tienen algunos productos naturales. Una vez obtenido el azúcar, por un proceso de fermentación o destilación, se obtiene el etanol hidratado.

Los costos de producción de etanol, y por consiguiente su precio, dependerán de varios factores; destacando:

- 1) El país donde se produce
- 2) El costo de la materia prima utilizada
- 3) La transformación de la materia prima utilizada
- 4) El consumo de energía
- 5) Precio de combustibles sustitutos
- 6) Los costos de otros elementos como mano de obra, tecnología, etc.

[Musalem, 2006]

A continuación se muestran un diagrama que ilustra la manera general de obtener bioetanol.

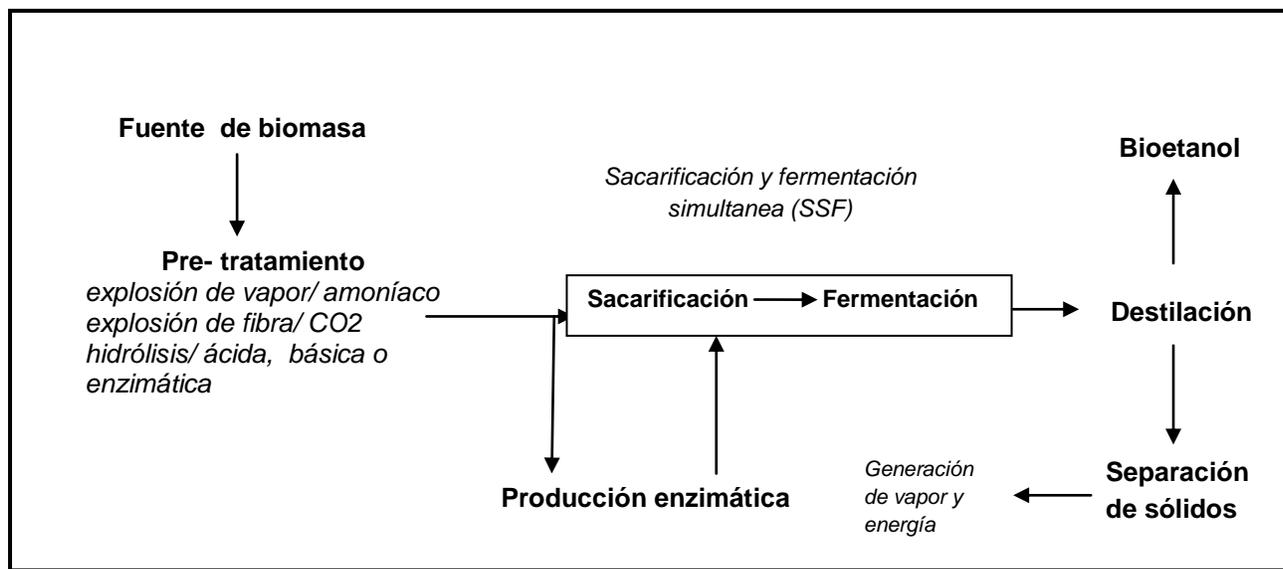


Figura 1. Varios procesos de producción de bioetanol a partir de biomasa [Nigam, et col., 2010]

PRODUCCIÓN DE BIOETANOL EN MÉXICO

Hay distintas razones por las que una economía como la mexicana necesita desarrollar nuevas fuentes de energías renovables (como el etanol) para seguir abasteciendo el crecimiento nacional. Económicamente es necesario reducir la dependencia del gobierno y de la economía hacia un recurso de carácter no renovable como los hidrocarburos. Por otra parte se necesitan, energías renovables menos contaminantes que sean capaces de reproducirse y emplearse por las futuras generaciones. Todas estas variables obedecen a un concepto mas amplio denominado desarrollo sustentable, este se define como aquel desarrollo que atiende a las necesidades de las presentes generaciones sin restringir las posibilidades que nuestros sucesores satisfagan las suyas [Flores, 2008].

En nuestro país hay una peculiar dependencia de los recursos petrolíferos como un componente importante de los ingresos del gobierno y como insumo energético. Desde la perspectiva del sector público, en el año 2006 los recursos

obtenidos por el petróleo constituyeron alrededor del 40% de los ingresos del sector público [Flores, 2008].

El uso del etanol mezclado con gasolina (gasohol) permitiría evolucionar hacia una racionalidad que implique el cuidado del medio ambiente, por medio de una explotación que respete los límites ecológicos en cuanto a su capacidad regenerativa para que estos puedan persistir para las futuras generaciones.

El etanol es conocido por ser un combustible limpio capaz de reducir los efectos de los gases de efecto invernadero proveyendo así de una serie de externalidades positivas comparando al etanol con la gasolina.

El etanol usado en mezcla como gasohol genera menor cantidad de emisiones de monóxido de carbono, CO.

Para poder mezclar etanol y gasolina, el etanol debe ser anhidro para que no haya presencia de agua y el etanol no se separe de la gasolina ya que se produciría el paro del motor y la corrosión de algunas partes metálicas. En el caso de los motores diseñados para etanol, estos no usan alcohol anhidro, ya que usan etanol con 5% o más de agua para su buen funcionamiento.

La mezcla de etanol y gasolina conocida como gasohol provee de una combustión mucho menos dañina para el motor y mas limpia, gracias a que el punto de ebullición del gasohol es menor que el de la gasolina, con lo que se desgasta menos el motor disminuyendo los residuos como carbón que se genera con gasolina, proporcionando una vida útil mas larga a los motores y dando ventajas económicas gracias a los cambios mas espaciados de platinos, filtros, etc. En caso de utilizarse etanol puro o alguno de sus derivados se adquiere un aumento de la potencia en el automóvil, reflejados en los caballos de fuerza [Flores, 2008]

TECNOLOGÍA DE LA FERMENTACIÓN

La tecnología de la fermentación o bioproceso es un componente importante de la mayoría de los procesos de biotecnología tanto nuevos como viejos y normalmente implica células vivas completas (de microbios, mamíferos o plantas), orgánulos o enzimas como biocatalizadores y cuyo objetivo es producir cambios químicos y/o físicos en materiales orgánicos (es decir, el medio) [Ward, 1989].

Las fases de la formación de productos en la tecnología del bioprocésamiento son en esencia muy similares, independientemente del organismo seleccionado, el medio usado y el producto formado. En todos los casos, crecen bajo condiciones definidas y controladas un gran número de células. Los organismos deben ser cultivados e incentivados a formar productos deseados por medio de un sistema contenedor físico/técnico (biorreactor) y la composición adecuada de medio y parámetros medioambientales reguladores del crecimiento tales como la temperatura y aireación. La optimización del bioproceso cubre tanto los sistemas biológicos como los técnicos [Smith, 2004].

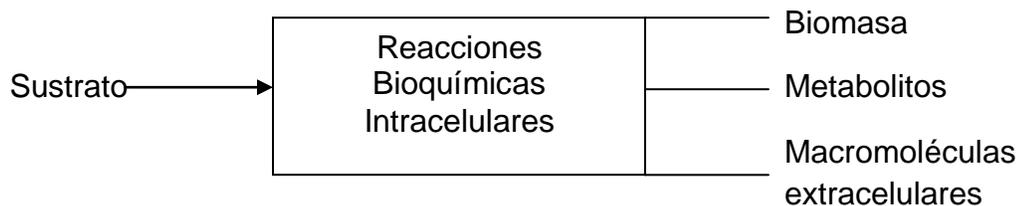


Figura 2. Procesos generales de Biotecnología [Smith, 2004]

PRINCIPIOS DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

El crecimiento de organismos puede verse como el incremento de material celular expresado en términos de masa o número de células y procede de una serie de pasos biológicos coordinados y muy complicados catalizados enzimáticamente. El crecimiento dependerá de la disponibilidad y transporte de nutrientes necesarios

para la célula, su subsiguiente captación y del mantenimiento óptimo de los parámetros medioambientales tales como la temperatura, el pH y la aireación.

Los tiempos de duplicación medios se incrementan con el aumento del tamaño celular y la complejidad; así por ejemplo, el tiempo de duplicación para bacterias es de 0.25-1h; levaduras 1-2h; esporas de los hongos 2-6.5h; células vegetales 20-70h; y células de mamífero 20-48h.

En los procesos biotecnológicos hay principalmente tres maneras de hacer crecer microorganismos en el biorreactor: *batch*, *semicontinuo* o *continuo*.

En un cultivo *batch* o *en lote*, los microorganismos son inoculados dentro de un volumen fijo de medio y, a medida que se produce el crecimiento, los nutrientes se consumen y se acumulan los productos de crecimiento (biomasa, metabolitos). El entorno de nutrientes dentro del biorreactor cambia continuamente, lo que a su vez impone cambios en el metabolismo celular. Eventualmente, la multiplicación celular cesa debido a que los nutrientes se vuelven limitantes o se agotan y debido también a la acumulación de productos de desecho tóxicos excretados.

La naturaleza compleja del crecimiento *batch* de microorganismos se muestra en la figura 2. La *fase lag* inicial es un tiempo de crecimiento no aparente, pero análisis bioquímicos reales demuestran un recambio metabólico, indicando que las células se encuentran en proceso de adaptación a las condiciones medioambientales y que el crecimiento comenzará eventualmente. Hay una fase de *aceleración temporal* en la que el inoculo comienza a crecer, seguida rápidamente por una *fase exponencial*. En la fase exponencial el crecimiento microbiano procede a la máxima velocidad posible para ese organismo en presencia de nutrientes en exceso y parámetros medioambientales ideales y en ausencia de inhibidores de crecimiento. Sin embargo, en los cultivos *batch* el crecimiento exponencial es de duración limitada y, a medida que las condiciones de nutrientes cambian, el índice de crecimiento disminuye, entrando en la *fase de deceleración*, seguida de la *fase estacionaria*, en la que el crecimiento total es imposible debido a la falta de nutrientes. La fase final del ciclo es la *fase de*

muerte, en la que el crecimiento cesa. La mayoría de los procesos *batch* biotecnológicos se detienen antes de alcanzar esta fase debido al metabolismo decreciente y a la lisis celular [Smith, 2004].

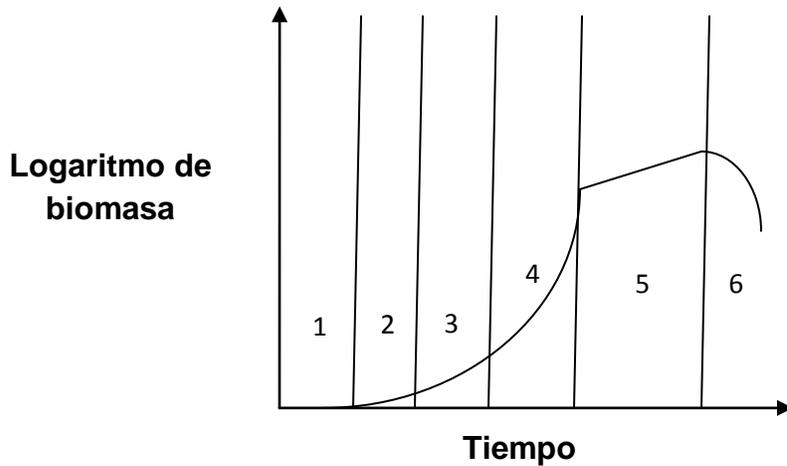


Figura 3. Características de crecimiento en un cultivo *batch* de un microorganismo. 1, Fase de retardo; 2, Aceleración transitoria; 3, Fase exponencial; 4, Fase de deceleración; 5, Fase estacionaria; 6, Fase de muerte. [Smith, 2004]

Las reacciones de fermentación son multifacéticas e implican una fase gaseosa (que contiene N_2 , O_2 y CO_2), una o más fases líquidas (medio acuoso y sustrato líquido) y una microfase sólida (el microorganismo y, posiblemente, sustratos sólidos).

En la fermentación los dos aspectos más relevantes, *rendimiento* y *productividad*, son medidas cuantitativas que indicarán de qué manera las células convierten el sustrato en producto. El rendimiento representa la cantidad de producto obtenido a partir del sustrato mientras que la productividad determina la velocidad de formación del producto [Smith, 2004].

MEDIOS PARA PROCESOS DE FERMENTACIÓN

El agua es el centro de todos los procesos biotecnológicos y en la mayoría de los casos será el componente dominante de los medios en los que los microorganismos van a crecer, por lo tanto la calidad del agua es muy relevante, ya que afecta al crecimiento microbiano y la producción de bioproductos específicos.

Los requerimientos nutricionales básicos de los microorganismos son el aporte de energía o carbono, una fuente de nitrógeno disponible, elementos inorgánicos y para algunos tipos celulares, factores de crecimiento específicos. En la mayoría de los procesos biotecnológicos las fuentes de carbono y nitrógeno proceden muy a menudo de mezclas relativamente complejas de productos naturales baratos o subproductos. [Smith, 2004]

Saccharomyces cerevisiae

La levadura ***Saccharomyces cerevisiae*** es el organismo mas frecuentemente utilizado en los procesos de fermentación. Esta levadura es hoy base para la elaboración de cervezas y destilados, para obtener muchas variedades de alimentos mediante procesos de cocción (pan) y también para el desarrollo de las técnicas vinícolas modernas. La forma actual del *S. cerevisiae* podría ser consecuencia evolutiva, mediante selección, de su aplicación en la producción de cerveza y vino. Probablemente es el primer microorganismo utilizado en beneficio del hombre. La levadura *S. cerevisiae* es capaz de asimilar y utilizar azúcares simples, como la glucosa y fructosa, metabolizarlos y convertirlos en etanol, ya que tiene una elevada tolerancia a este compuesto [García, 1993].

El *S. cerevisiae* es el primer eucarionta cuyo genoma fue secuenciado por completo; esta secuenciación, sin duda, conducirá a nuevas aplicaciones en la producción de cerveza, en la industria de alimentos obtenidos por cocción y en otros campos hoy todavía inéditos [García, 1993].

LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La fermentación alcohólica es una biorreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la ecuación:



Las principales responsables de esta transformación son las levaduras. La *Saccharomyces cerevisiae*, es la especie de levadura usada con más frecuencia. Por supuesto que existen estudios para producir alcohol con otros hongos y bacterias, como la *Zymomonas mobilis*, pero la explotación a nivel industrial es mínimo.

A pesar de parecer, a nivel estequiométrico, una transformación simple, la secuencia de transformaciones para degradar la glucosa hasta dos moléculas de alcohol y dos moléculas de bióxido de carbono es un proceso muy complejo, pues al mismo tiempo la levadura utiliza la glucosa y nutrientes adicionales para reproducirse. Para evaluar esta transformación, se usa el rendimiento biomasa/producto y el rendimiento producto/ substrato.

- Rendimiento biomasa/substrato ($Y_{x/s}$): es la cantidad de levadura producida por cantidad de substrato consumido.
- Rendimiento substrato/producto ($Y_{p/s}$): es la cantidad de producto sintetizado por cantidad de substrato consumido.

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO_2 por 1 g de glucosa. Este valor fue cuantificado por Gay Lussac. En la realidad es difícil lograr este rendimiento, porque como se señaló anteriormente, la levadura utiliza la glucosa para la producción de otros metabolitos. El rendimiento experimental varía entre 90% y 95% del teórico, es decir, de 0.469 a 0.485 g/g.

Los rendimientos en la industria varían entre 87 y 93% del rendimiento teórico. Otro parámetro importante es la productividad (g/h/l), la cual se define como la cantidad de etanol producido por unidad de tiempo y de volumen. [Vázquez, 2007]

ANTECEDENTES DE *Pittocaulon praecoex* (PALO LOCO)

Pittocaulon praecoex es un árbol fanerofito, hermafrodita y caducifolio, mide de dos a tres metros de altura. Los tallos son carnosos, pálidos frágiles y lisos, a continuación se describen brevemente las características de dicha planta.

Hojas: Cordiformes, palmatinervias. El ápice es agudo y se encuentran amontonadas en los extremos superiores de las ramas.

Flores: Cabezuelas de color amarillo.

Aspectos ecológicos: Sus semillas son dispersadas por el viento. Los tallos están adaptados para almacenar grandes cantidades de agua.

Usos: Las hojas se usan en un té que sirve para problemas de la piel, para combatir el reumatismo y las heridas.

Fenología: Florece de febrero a junio; fructifica de junio a enero y pierde sus hojas de mayo a septiembre. [Rojo, 2002]

Zona Geográfica: Se encuentra en un rango de hábitats que va desde los 100 a los 5800 m de elevación en áreas empinadas y rocosas, creciendo en bosques secos, tropicales o de maleza. Están distribuidas en los estados de Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Zacatecas y en el D.F. Las especies *P. praecox* y *P. velatum* son las que presentan mayor distribución y las demás son de distribución reducida localizándose en la Sierra Madre del Sur, Michoacán, Guerrero, Colima y Jalisco [Rzedowski, 1983]



IV) JUSTIFICACIÓN

Los biocombustibles son una alternativa al consumo de energéticos derivados del petróleo, además también contrarrestan los diversos efectos ambientales causados por la gran demanda de estos, por ello el país está fomentando la producción de biocombustibles como el etanol a partir de recursos vegetales para el desarrollo de bioenergéticos.

Se estima que la utilización del bioetanol en el 2008 represento el 1.4% del consumo mundial de petróleo. El 23% de la producción mundial del bioetanol se destina a las industrias procesadoras, el 61% a combustible y el 16 % restante a la industria de bebidas. [Gutiérrez, Vivanco, 2009]

Por lo que la obtención de bioetanol, a partir de *Pittocaulon praecoex* es una alternativa interesante, pues como materia prima no tiene ningún uso práctico y es muy abundante en la Republica Mexicana y en Centroamérica. Ya que la preocupación principal hoy en día es que las materias primas para la producción de etanol son azúcares ubicados en la caña, remolacha o almidón presente en los cereales, por lo que acceder a otras fuentes de azúcar, incluyendo otros tipos de biomasa, como los materiales lignocelulósicos, será necesario para que la industria se expanda, dejando así de utilizar fuentes sustentables para los seres humanos [Mabee, W.E, et al col, 2011], además de que se enfrentara la dependencia que se tiene a los combustibles derivados del petróleo y se dará paso a biocombustibles renovables principalmente bioetanol.

V) OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ④ Evaluar el potencial de *Pittocaulon praecoex* como una fuente natural de azúcares que se pueda utilizar como alternativa para la obtención de BIOETANOL.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Determinar la concentración de azúcares de los concentrados acuosos en diferentes condiciones de maceración.
- ✓ Realizar fermentaciones con la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) utilizando los azúcares presentes en los extractos.
- ✓ Obtención y cuantificación de **Bioetanol**.

VI) MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología General

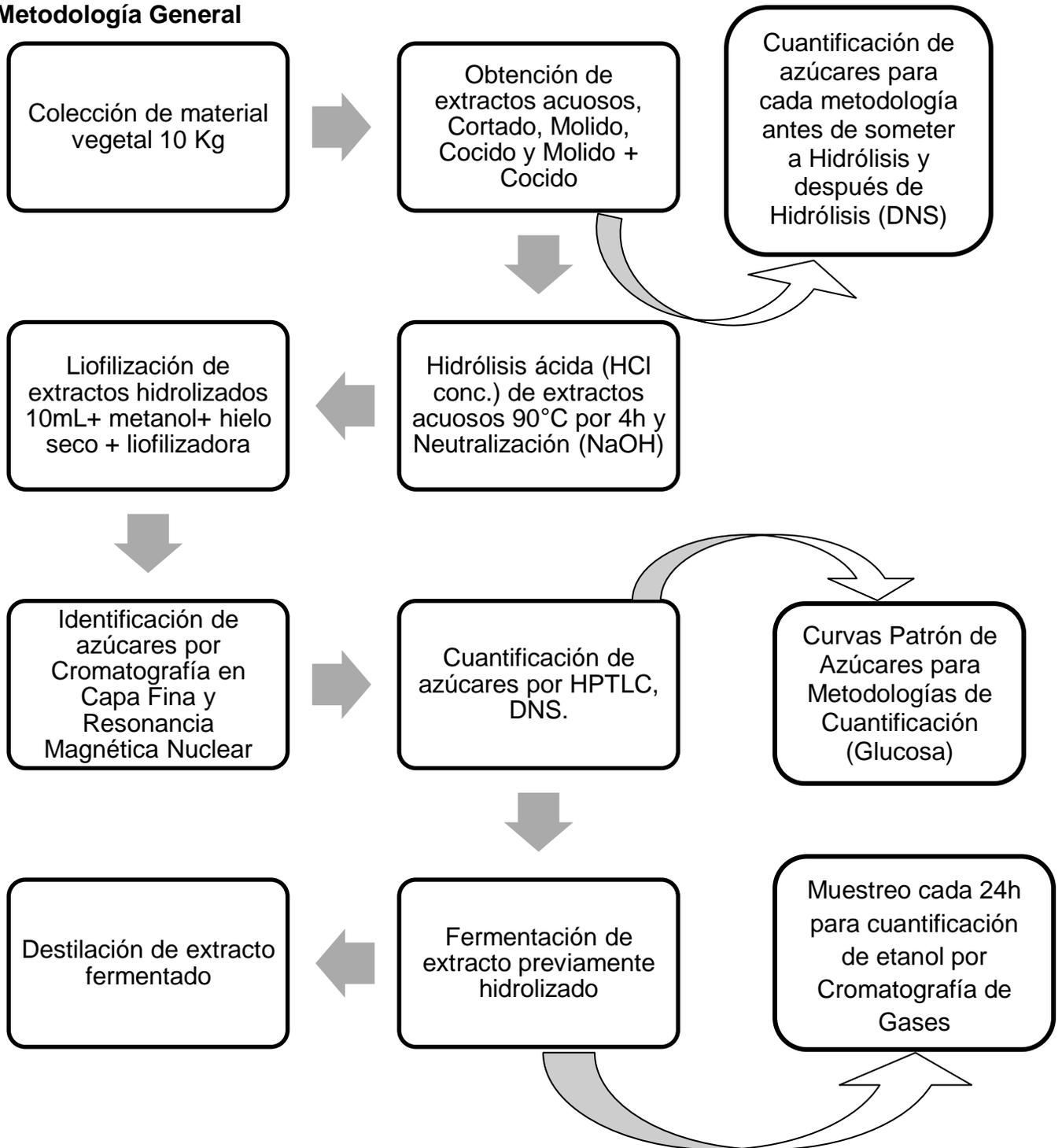


Diagrama de proceso para la obtención de bioetanol a partir de Palo loco

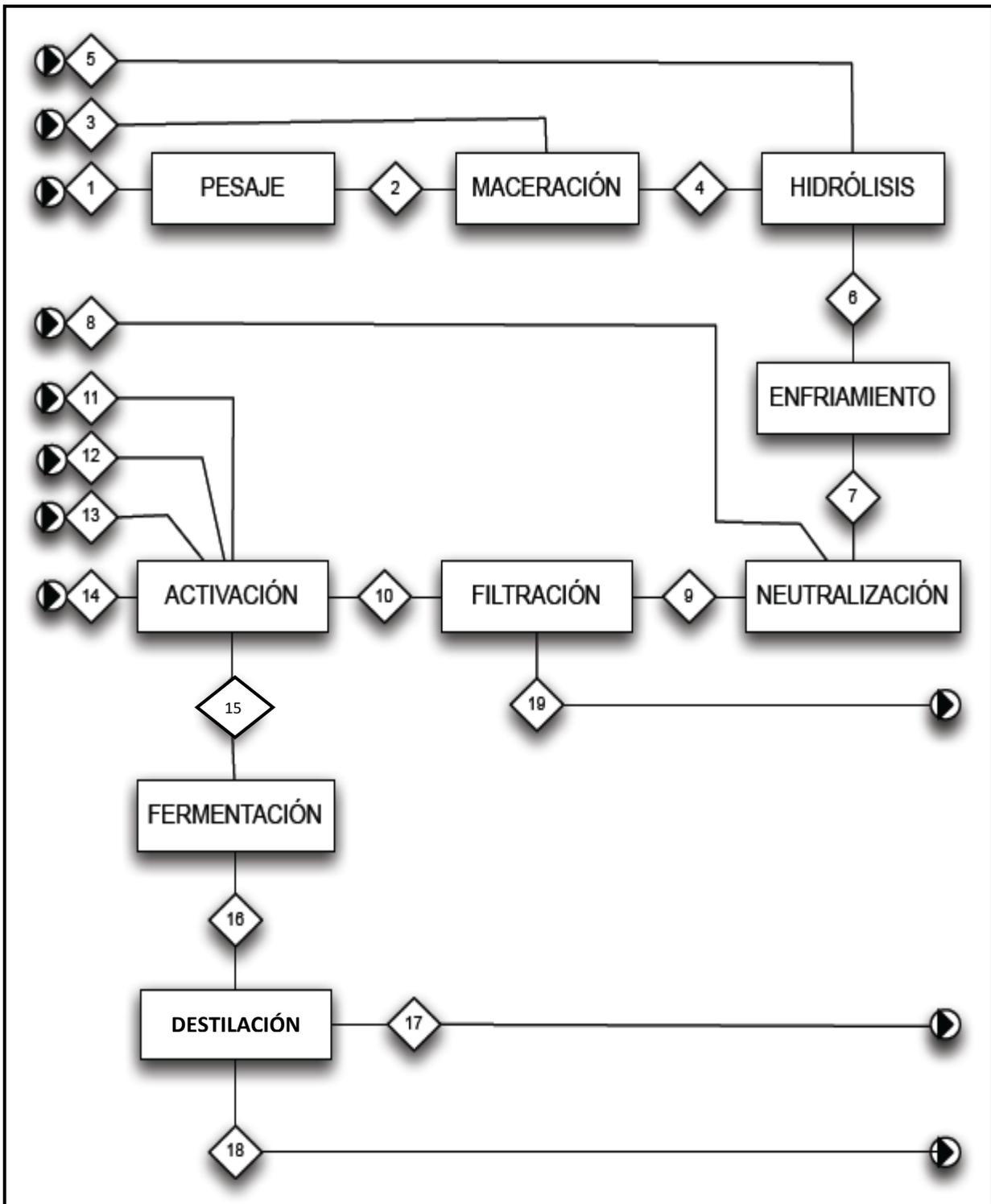


Figura 4. Diagrama de proceso

No. Corriente	Nombre	Gramos (g)
1	Palo loco	500
2	Agua	500
3	Extracto	1000
4	HCl concentrado	3
5	Hidrolizado	1000
6	Hidrolizado frío	1000
7	NaOH	10
8	Hidrolizado neutro	1000
9	Solución	250
10	(NH ₄) ₂ SO ₄)	0.25
11	KH ₂ PO ₄	0.75
12	Peptona	3.75
13	Levadura	1.25
14	Extracto	250
15	Extracto fermentado	20
16	Residuo	-
17	Destilado	-
18	Etanol	Según método
19	Residuo sólido	-

Tabla 1. Descripción de corrientes ilustradas en diagrama de proceso

Recolección del material vegetal

La planta habita en una extensión bastante amplia a lo largo y ancho de la Republica Mexicana y en diversos puntos de la Ciudad de México, como por ejemplo, en las instalaciones de Ciudad Universitaria, por lo que se realizó una colecta en zonas aledañas.

Se recolectaron 10Kg de los tallos de la planta en el mes de Agosto y esta se mantuvo almacenada en una bodega, en condiciones ambientales, se realizaron una serie de monitoreos a lo largo de un año, para estandarizar la pérdida de agua, características físicas y contenido de azúcares de los tallos almacenados.

Obtención de los extractos acuosos sin hidrolizar de los tallos de *Pittocaulon praecoex*

A) Tallos Cortados en trozos

Para la obtención del extracto, se pesaron 500g de tallos de *P. praecoex*, se cortaron en trozos pequeños con la ayuda de una tijera alicata, se colocaron en un matraz bola de 1 L y se adicionaron 500 mL de agua. Se dejaron en reposo por 24 h, pasando el tiempo se filtró y se obtuvo el extracto, al cual se le cuantificó azúcares por DNS.

B) Tallos Molidos

Para la obtención de este extracto, se pesaron 500 g de tallos de *P.praecoex*, se cortaron en trozos pequeños con la ayuda de una alicata y se molieron con un Braun (**TAURUS ROBOT 300**), debido a que la corteza de la planta es muy dura se adicionaron 50 mL de agua para facilitar la molienda. Una vez molida se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 1 L y se le adicionaron 500 mL de agua, se mantuvieron en agitación continua por 24 h, pasado el tiempo se filtraron 20 mL de extracto para realizar la cuantificación de azúcares por DNS y para posteriormente realizar la hidrólisis ácida (HCl).

C) Tallos Cocidos

Para la obtención de este extracto se pesaron 500 g de tallos de *P. praecoex*, se cortaron en trozos pequeños con la ayuda de una alicata y se colocaron en una olla express (**MAGEFESA**), se adicionaron 300 mL de agua y se sometió a cocción por 20 min. Pasado el tiempo se sacó de la olla y se adicionaron 200 mL mas de agua, posteriormente se machacó la planta cocida con la ayuda de un mortero, esto con la finalidad de extraer todo el agua que pudiera retener la planta, se filtro el extracto y a este, se le realizo la cuantificación de azúcares por DNS para posteriormente realizar la hidrólisis ácida (HCl).

D) Tallos Molidos y Cocidos

Para la obtención de este extracto se pesaron 500 g de tallos de *P. praecoex* se cortaron en trozos pequeños con la ayuda de una alicata y se colocaron en una olla express (**MAGEFESA**), se adicionaron 250 mL de agua y se sometió a cocción por 20 min. Pasado el tiempo, se sacó de la olla y se molió con un Braun (**TAURUS ROBOT 300**), la corteza de la planta se ablandó por lo que la molienda resulto ser mas sencilla, al concluir con la molienda se adicionaron 250 mL de agua y el extracto se colocó en un Matraz Erlenmeyer de 1 L y éste se mantuvo en agitación continua por 24 h, pasado el tiempo se filtraron 20 mL de extracto, para realizar cuantificación de azúcares por DNS para posteriormente realizar la hidrólisis ácida (HCl).

Obtención de los extractos acuosos hidrolizados

Para todos los extractos **A, B, C y D sin hidrolizar**, se usó la misma metodología: Se colocó el extracto sin filtrar en una parrilla hasta alcanzar 90°C, se le adicionó ácido clorhídrico concentrado (HCl conc) hasta obtener un pH \approx 1 y se mantuvo en agitación constante en estas condiciones por 4 h, pasado el tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente, una vez frío se adicionó hidróxido de sodio (NaOH) para neutralizar el extracto hasta obtener un pH \approx 6. Una vez neutralizado se le realizó la prueba de DNS y se mantuvo el extracto en refrigeración hasta la fermentación.

Liofilización de los extractos hidrolizados

Se eliminó el agua por liofilización, en una liofilizadora de alto vacío (**LABCONCO**) cuya presión es de 0.0001 mmHg, se concentraron los compuestos presentes en el extracto (azúcares). Para realizar la liofilización lo primero que se hizo fue congelar la muestra con hielo seco (-40°C) y metanol, para de disminuir drásticamente la temperatura y asegurar la congelación total del agua se colocaron 10 mL de extracto. Una vez que se congelaba la muestra, esta se colocaba en la liofilizadora y para la obtención del extracto totalmente seco después de 7 h.

Métodos de Identificación de Azúcares

A) Por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

A los extractos se les realizaron una serie de placas (CCF), para detectar los azúcares presentes en el extracto, para la realización de las placas se usaron como patrones los siguientes: glucosa, sacarosa y fructosa, estos se eligieron por ser los más comunes, sin embargo se detectó la presencia de otros. Como eluyentes se usó una relación (7:3) de acetato de etilo: metanol y (8:2) acetonitrilo: agua. Como reveladores se utilizaron sulfato cérico ó solución de alfa-naftol, se realizaron placas para los extractos no hidrolizados y para los hidrolizados. [Ávila, 2009]

B) Por Resonancia Magnética Nuclear

Los extractos liofilizados sólidos café (39 mg), se les realizaron los experimentos de ¹H RMN en el equipo de 200MHz Varian Gemini en D₂O. (Espectros ANEXO 1)

Métodos de Cuantificación de Azúcares

A) Por HPTLC [Cimpoi, C., 2005]

Para la cuantificación de azúcares por HPTLC, se utilizó un equipo **CAMAG** por medio del programa (**WITCATS**) con toda la información que requería el programa, es decir, cantidad de muestra colocada en la solución, volumen de disolvente que se agregó a la muestra, frente de disolvente de la placa, cantidad de muestra colocada en la placa, etc. Se determinó la cantidad de azúcares presentes en la muestra, esto por que el equipo usó lámparas de absorción de luz ultravioleta, de deuterio (260 nm - 280 nm) y región visible de tungsteno (490 nm - 550 nm)

Para cuantificar los azúcares se realizó una curva patrón (ANEXO 2), se usaron diferentes concentraciones de glucosa (0.8 mg, 1 mg, 1.5 mg, 2 mg y 15 mg/ mL de agua), y del extracto se usó una concentración de 1 mg/mL de agua. La placa se colocó en el aparato, para cuantificarla, sin embargo para que el aparato las detectara estas fueron reveladas con α -naftol, el color que obtenido fue morado, se debe leer en la luz visible a 525 nm.

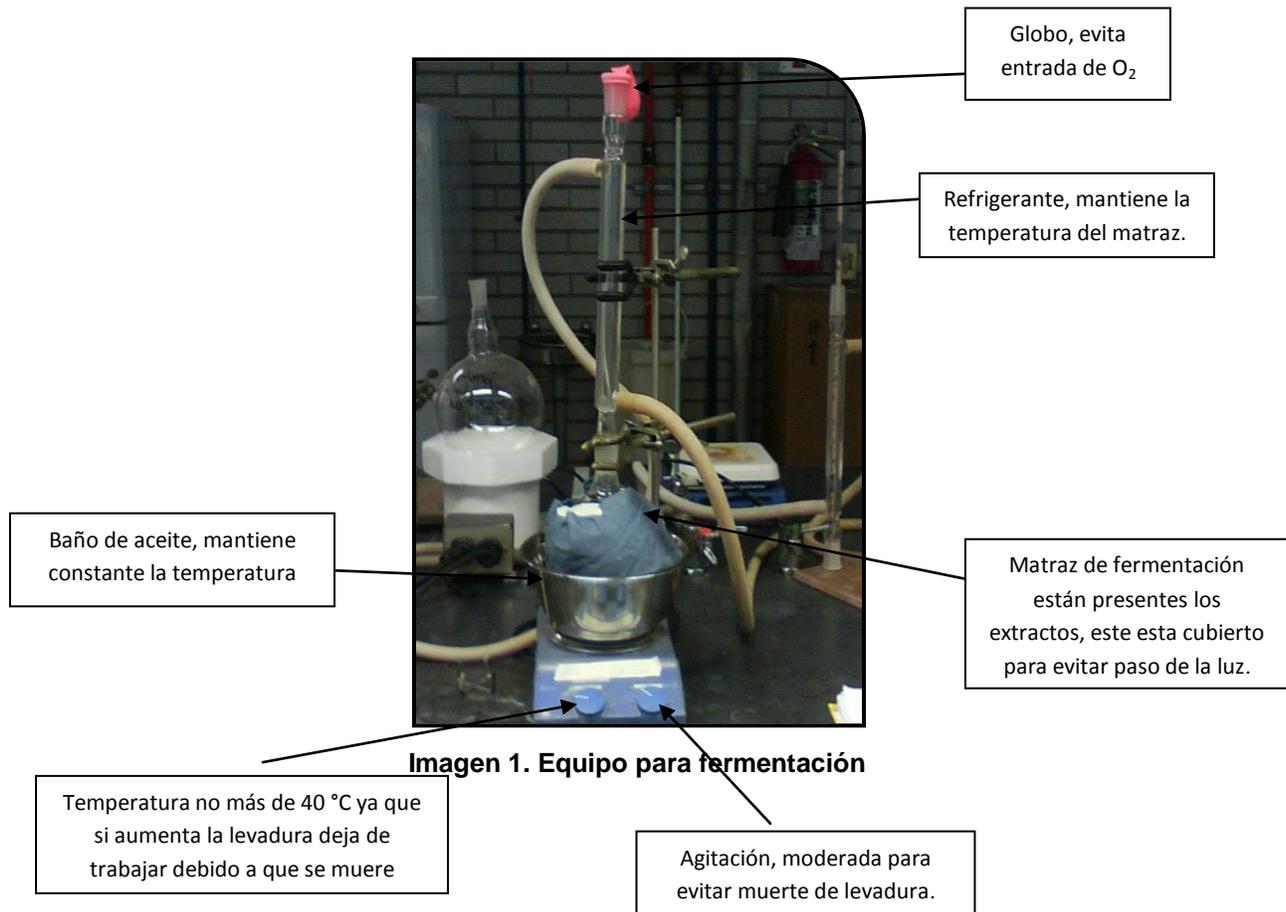
B) Azúcares Reductores por DNS (ácido dinitrosalicílico) [Lorenz G., 1959].

Se cuantificaron azúcares reductores por medio de este método, se preparo el reactivo de DNS (ANEXO 3), la cuantificación se realizo preparando la curva patrón(ANEXO 4) con diferentes concentraciones de **glucosa (0, 0.2, 0.5, 0.8, 1.1, 1.4, 1.7 y 2 mg / mL)** se colocó 1 mL de cada concentración en un tubo de ensayo y se les adicono 1 mL de reactivo DNS se calentaron por 5 min, pasado el tiempo se adicionaron 10 mL de agua destilada. Estas muestras se leyeron en un espectrofotómetro (**SPECTRONIC® GENESIS 5**) a una longitud de onda de 540 nm. Se realizaron los respectivos cálculos y se obtuvo así la ecuación de la recta que nos sirvió para conocer la concentración de azúcares reductores de los diferentes extractos realizados. Si los resultados obtenidos con los extractos no entraban en la curva patrón, se realizaban diluciones ($\frac{1}{10}, \frac{1}{100}$) dependiendo la concentración de la muestra.

Fermentaciones

Metodología General de la Fermentación

Las fermentaciones se realizaron en un equipo como el que se muestra en la figura 1, en el matraz de fermentación se colocaron 250 mL de los extractos hidrolizados y se le adicionaron sales en la siguiente cantidad: 0.25 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 0.75 g KH_2PO_4 , así como, 3.75 g peptona única adición. Y la adición de 1.25 g de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) cada 24 h (Juárez, Vivanco, 2009.) durante 72 h, se controlaron diversos factores como: temperatura constante toda la fermentación (30°C), agitación suave, paso de Oxígeno y luz.



Cada 24h se monitoreaba la fermentación tomando una muestra de 1mL, se le realizó cromatografía de gases para cuantificar bioetanol.

Destilación de Extractos Fermentados. Obtención de Bioetanol.

La destilación del etanol se realizó en un rotavapor (**BUCHI ROTAVAPOR R-205**), con una temperatura de 40°C y una presión de 170 mbar, el matraz se mantuvo a una velocidad de 140 rpm hasta que se destilara completamente el etanol, tuvo una duración de 1 h 30 min.

Una vez concluida la destilación se tomó 1 mL de muestra y se cuantificó por Cromatografía de Gases (CG).



Imagen 2. Equipo de destilación

Cuantificación de etanol por Cromatografía de Gases

El equipo utilizado fue un Cromatógrafo de Gases **Agilent 6890** y las condiciones de operación fueron las siguientes:

Se utilizó una columna **AT-AquaWax 30 m x 0.25 mm x 0.25 um**, el gas portador fue **Hidrógeno**, el flujo fue de 2.2 mL/min, el Split 1:50, la temperatura del inyector fue de 150 °C, se usó un detector de **ionización de flama**, la temperatura del detector fue de 200°C, la temperatura inicial del horno fue de 40°C y el tiempo inicial fue de 3 min.

Para la cuantificación de etanol por CG se realizó un análisis cuantitativo, con las muestras (24, 48, 72 h y Destilado), por el método de estándar interno utilizando una solución de 0.1% v/v de n-propanol como estándar interno. Se prepararon 5 diluciones de bioetanol. A 100 µL de cada una de estas diluciones se les agregaron 100 µL de la solución de estándar interno (n-propanol). Y se realizó una curva patrón que se utilizó para conocer la concentración de etanol presente en las muestras.

ANÁLISIS DE DATOS

Los datos obtenidos se analizaron con el programa **GraphPad InStat 3** y se aplicó un análisis de ANOVA y la prueba de Turkey.

VII) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pérdida de agua en material vegetal recolectado

La planta se almacenó en una bodega ubicada en el Instituto, sin ningún control de temperatura o presión, en una caja de cartón y se realizaron una serie de monitoreos, a lo largo de un año para saber si los tallos de *P. praecoex* conservaban condiciones óptimas. A continuación se mencionan 3 monitoreos importantes realizados a lo largo del estudio. En apéndice 1 se coloca un ejemplo de cálculo.

Tabla 2		
Peso inicial de la plata 1er monitoreo 10.55 Kg de planta	Peso final de la planta 2do monitoreo 9.7 Kg de planta	% de agua perdida 8.05 % de agua perdida al primer mes
Peso inicial de la planta 2do monitoreo 9.7 Kg de planta	Peso final de la planta 3er monitoreo 7.3 Kg de planta	30.80 % de agua perdida al sexto mes
Peso inicial de la planta 3er monitoreo 7.3 Kg de planta	Peso final de la planta 4to monitoreo 5.1Kg de planta	51.65 % de agua perdida a los doce meses
Tabla 2. Se indican pesos y porcentaje de agua perdido en la planta a lo largo del estudio		

Imágenes

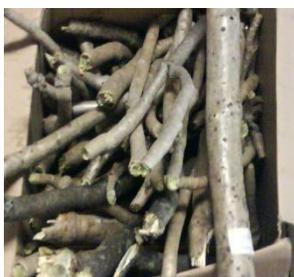


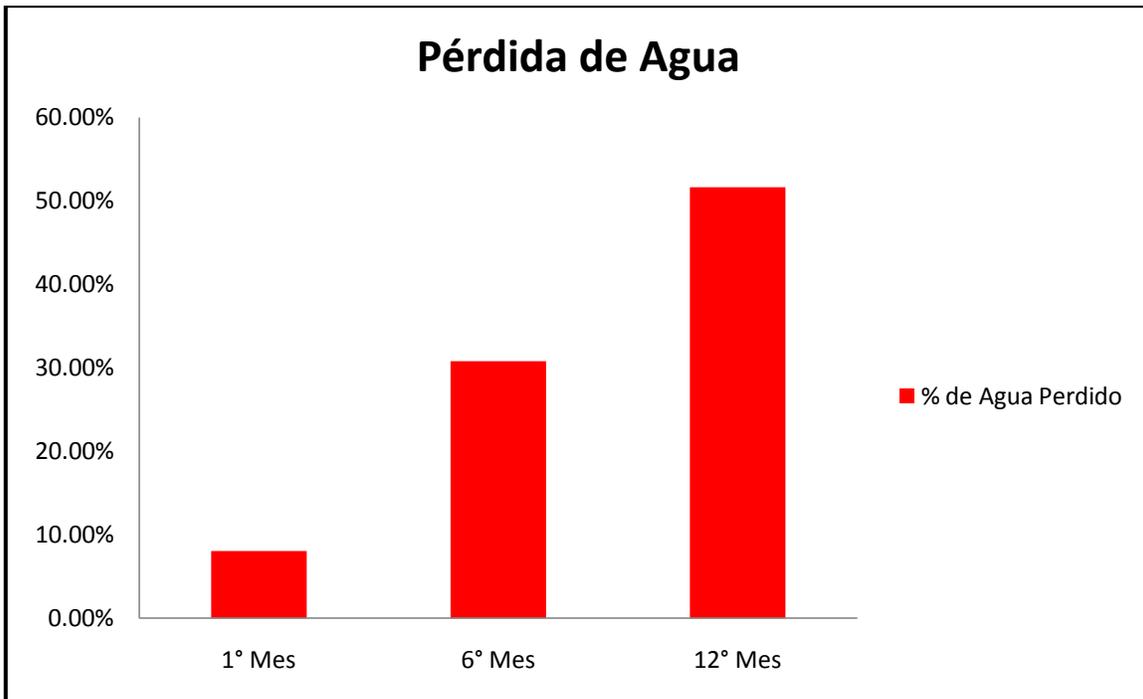
Imagen 3. 1° mes



Imagen 4. 6° mes



Imagen 5. 12° mes



Gráfica 1. Representación del porcentaje de agua que perdió *P. praecoex* a lo largo del estudio.

En la gráfica 1 se observó que a lo largo del experimento la pérdida de agua es directamente proporcional al tiempo, es decir que a medida a que transcurrió el estudio los tallos de *P. praecoex* fueron perdiendo una mayor cantidad de agua hasta que estuvieron parcialmente deshidratados (Ver imagen 3). Como se observó en la imagen 3 correspondiente al primer mes, los tallos se encontraban en buenas condiciones no presentaron deshidratación, ni ataque de microorganismos. En la imagen 4 correspondiente al sexto mes, los tallos ya presentan una deshidratación mayor, no presentan ataque de microorganismos, insectos o plagas, se observó que el olor se iba atenuando a medida que pasaba el tiempo y el color era más pálido. A los doce meses de monitoreo los tallos ya se encontraban muy deshidratados, se perdió el olor característico de *P. praecoex*, pero nunca presentó ataque por microorganismos, plagas o insectos, probablemente debido a los compuestos antimicrobianos que tiene.

Otra característica es que crece prácticamente todo el año y en diferentes regiones del país. Debido a que sus requerimientos nutricionales no son estrictos,

almacena grandes cantidades de agua soportando así casi cualquier clima y brindándole la capacidad de crecer en distintas regiones; lo vuelve un recurso sustentable que puede subsanar la demanda de nuevas fuentes naturales que no sean alimentos y que a su vez posean fuentes de carbono que sean utilizadas como biocombustibles.

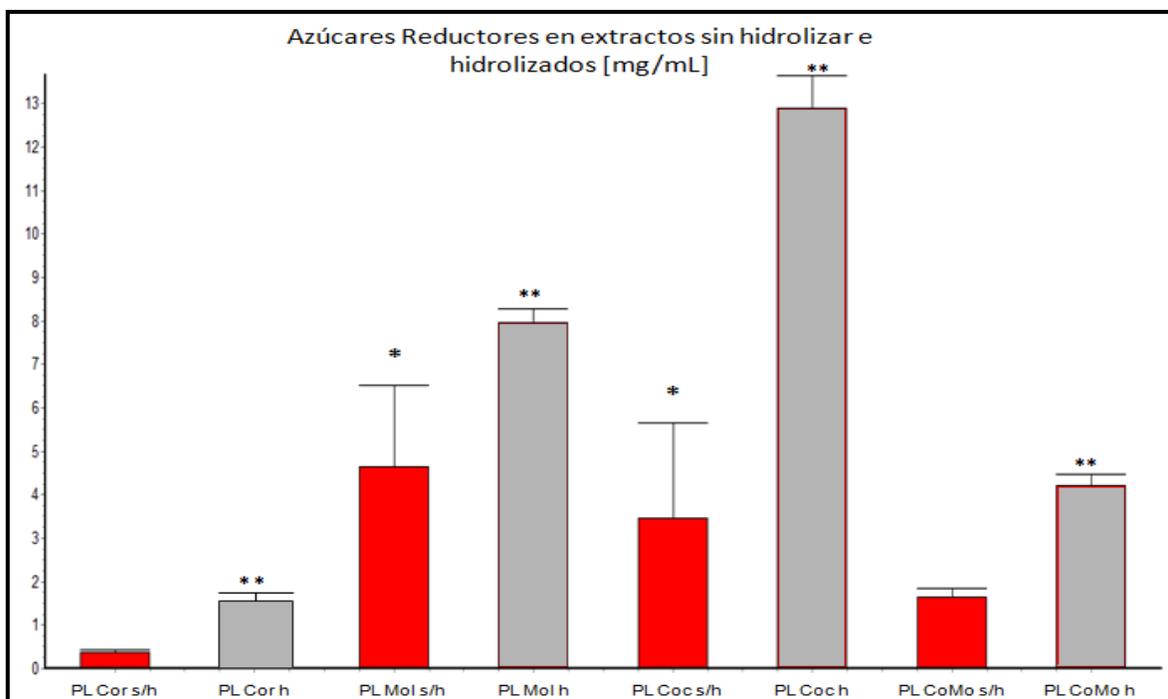
Cuantificación de azúcares por DNS de los extractos acuosos sin hidrolizar e hidrolizados

A todos los extractos **A, B, C y D sin hidrolizar e hidrolizados** se les determinó concentración de azúcares reductores totales por la metodología de DNS [Análisis de alimentos, 2009]. Este análisis se realizó para ver si la hidrólisis aumentaba la cantidad de azúcares presentes en los extractos, generando así una mayor obtención de bioetanol al momento de realizar las fermentaciones. Los resultados se muestran en la tabla 2 y en los gráficos 2, 3 y 4 se comparan las metodologías empleadas.

Tratamientos	Concentración de azúcares reductores sin hidrolizar [mg/mL]	Concentración de azúcares reductores hidrolizados [mg/mL]
Palo Loco cortado	0.8756 ± 0.068*	1.7654 ± 0.059**
Palo Loco molido	4.6333 ± 1.886*	7.9509 ± 0.331**
Palo Loco cocido	3.4747 ± 2.169	12.8844 ± 0.756**
Palo Loco Cocido y Molido	1.6328 ± 0.211	4.2105 ± 0.211**

Tabla 3. Concentración de azúcares reductores ($\bar{x} \pm DS$); Análisis ANOVA, Prueba de Turkey, n=3; *

****Presentan diferencia significativa *($p < 0.05$) ; ** ($p < 0.001$)**



Gráfica 2. Representación gráfica de la desviación estándar en la concentración de azúcares reductores [mg/mL] en muestras sin hidrolizar e hidrolizadas, **PLCor** Palo loco cortado; **PLMol** Palo Loco molido; **PLCoc** Palo Loco cocido; **PLCoMo** Palo Loco cocido y molido. A los datos se les realizó un análisis ANOVA y prueba de Turkey. (*) (**) **Presentan diferencia significativa** *($p < 0.05$); ** ($p < 0.001$) n=3 determinaciones por metodología.

En la tabla 3 la hidrólisis favoreció el aumento de azúcares reductores en todos los tratamientos, sin embargo, dependiendo la metodología presentó una mayor o menor concentración. En la gráfica 2 (color negro) se ilustra la concentración de azúcares reductores antes de la hidrólisis, en este caso en Palo Loco molido y Palo Loco cocido presentaron un incremento en la concentración. En el caso del PL molido se puede atribuir a que al moler perfectamente la planta, se liberó una mayor cantidad de azúcares reductores disponibles presentes en la corteza y centro de la planta, y en el caso del PL cocido podemos adjudicar que la cocción a alta presión ayuda a que se incremente la cantidad de azúcares.

En la gráfica 2 (color gris), se observa que en todas las metodologías después de la hidrólisis ocurre un incremento de azúcares reductores. Este efecto, lo adjudicamos a que en la membrana de los tallos de *P. praecoex* se pudieron encontrar cadenas de azúcares que con la ayuda de la hidrólisis se rompieron permitiendo así una mayor concentración, haciéndolos más disponibles durante la

fermentación, lo que provoca el aumento de glucosa siendo éste el sustrato principal de la fermentación. En la bibliografía se menciona que al realizar un pre-tratamiento con hidrólisis ácida de la biomasa en este caso Palo loco, favorece la disminución de la cristalinidad de la celulosa, mejorando así la hidrólisis, generando azúcares disponibles en la fermentación [Zawawy *et al col.* 2011].

En la gráfica 2 se comparan todas las metodologías antes y después de la hidrólisis. De las 4 metodologías en la que se observa un mayor incremento de azúcares fue en la que palo loco se cuece. Esto se atribuye a que, al existir un incremento de presión y temperatura, se rompen con mayor facilidad las membranas de la planta liberando así más azúcares, y si además de la cocción se realiza una hidrólisis todos los azúcares que se encuentran ramificados se rompen liberando así una mayor cantidad de glucosa, sin embargo con este tipo de tratamiento podemos generar otra clase de reacciones como las de Maillard en donde los azúcares están presentes, pero no están disponibles en la fermentación.

Para el tratamiento de los datos se realizó un análisis estadístico, con el que se compararon los tratamientos antes y después de la hidrólisis. En el gráfico se puede observar que solo dos metodologías presentan diferencias significativas Palo Loco molido y Palo Loco cocido, con esto se concluye que de los cuatro métodos, solo dos son los adecuados para utilizarse sin realizar hidrólisis, ya que, la concentración de azúcares reductores es mayor comparada con las metodologías que no presentan diferencia significativa. Sin embargo, se observa que todas las metodologías presentan diferencia significativa, lo que indica que la hidrólisis favorece al incremento de azúcares por lo que se pueden obtener mayores rendimientos de bioetanol, haciendo mucho más viable la utilización de los tallos de *P. praecoex* como fuente generadora de biocombustible.

La **liofilización** se utilizó como un método para almacenar de una manera más sencilla y práctica los extractos utilizados, así como para observar la pérdida de agua de los extractos, que en este caso fue del 97.96% y el rendimiento del extracto del 2.03%; lo que indica que la cantidad de azúcares es muy pequeña, ya que en su mayoría el extracto es netamente agua. En el apéndice 2 se muestran los cálculos del agua que pierde el extracto así como el rendimiento.

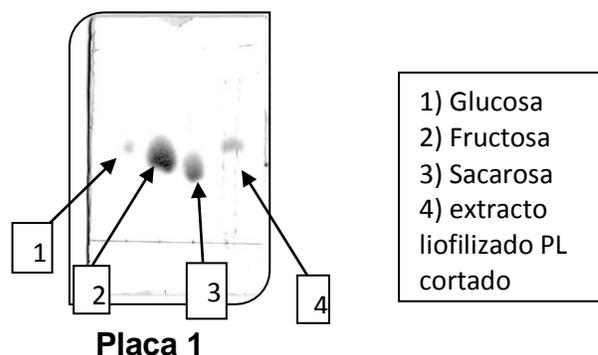
A continuación se muestran imágenes de los extractos en la liofilizadora, y de los extractos una vez secos.



Extracto obtenido después de la liofilización



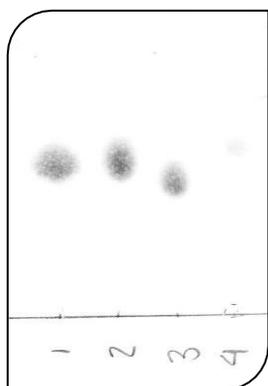
Como se observa en las imágenes, el extracto es un sólido café y este queda completamente seco. Se realizó una placa (CCF) en donde se observa que la cantidad de azúcares aumenta una vez que la muestra se somete a la liofilización, debido a que se elimina el agua del extracto, permitiendo así su concentración. En la mancha 4 de la placa se hace más visible la presencia de azúcares que en la placa en donde el extracto estaba en su forma original.



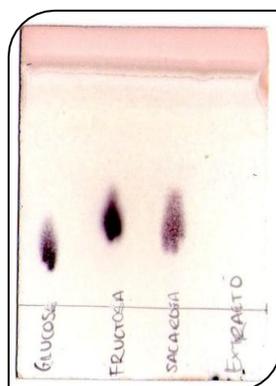
Identificación de azúcares por Cromatografía en Capa Fina CCF

A continuación se muestran placas de cromatografía en capa fina antes y después de la hidrólisis, en las cuales se observa como la hidrólisis tiene una repercusión importante. En las placas realizadas antes de la hidrólisis se observan pequeñas manchas correspondientes a los diferentes extractos; sin embargo cuando se realiza la hidrólisis la mancha correspondiente a los extractos se hace visible, en todos los casos.

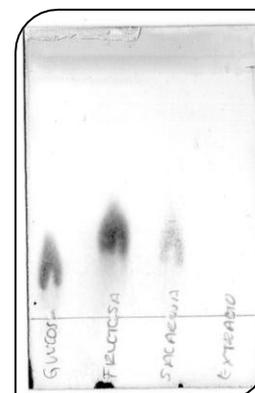
Placas de extractos sin hidrolizar



Placa 2. Palo Loco cortado



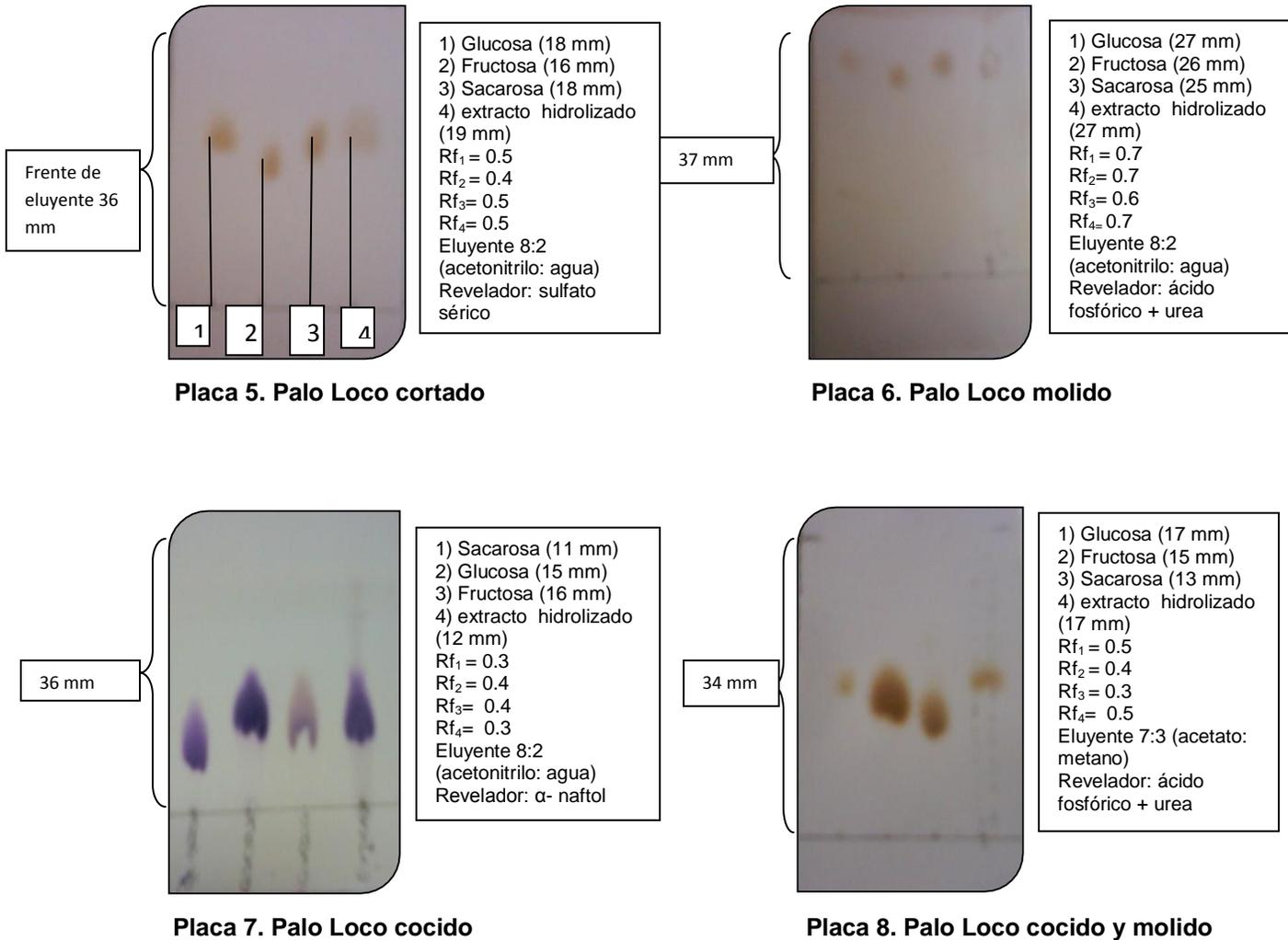
Placa 3. Palo Loco molido



Placa 4. Palo Loco cocido

- 1) Glucosa
 - 2) Fructosa
 - 3) Sacarosa
 - 4) Extracto sin hidrolizar PL. Cortado
- Eluyente 7 : 3
Acetato de etilo : Metanol
Revelador: (1) Sulfato cérico
(2), (3) α -naftol

Placas de extractos hidrolizados



Según se observa en las placas 1, 2 y 3, la presencia de azúcares antes de la hidrólisis es casi inapreciable, probablemente por que los azúcares no están plenamente disponibles en el extracto o se encontraban muy diluidos, por lo tanto no se pudieron identificar correctamente en las placas.

Con los extractos hidrolizados, se realizaron diferentes placas (CCF) para identificar azúcares. Se usaron diferentes reveladores como es el caso de α -naftol específico para azúcares ya que interacciona con el grupo hidroxilo, dando así una

coloración específica, por ejemplo la glucosa se tiñe de morado, como es el caso de la placa 7. Esta se reveló con α -naftol y se observa que en el extracto está presente la glucosa ya que se tiñe del mismo color que la glucosa patrón. También se usaron eluyentes adecuados para los azúcares en este caso mezclas polares como; (8:2) acetonoitrilo: agua [N. S. Han, 1998].

Como se observa en las placas 4, 5, 6 y 7, la hidrólisis ayuda a que se puedan apreciar mejor los azúcares en las placas de CCF, ya que las condiciones a las que se lleva a cabo favorecen el rompimiento de estructuras que puedan contenerlos, permitiendo su liberación y volviéndolos aprovechables para la fermentación. En las placas se indican los RF (apéndice 2), así como el eluyente y el revelador utilizados [Ávila, 2009].

Identificación de azúcares por resonancia magnética nuclear RMN

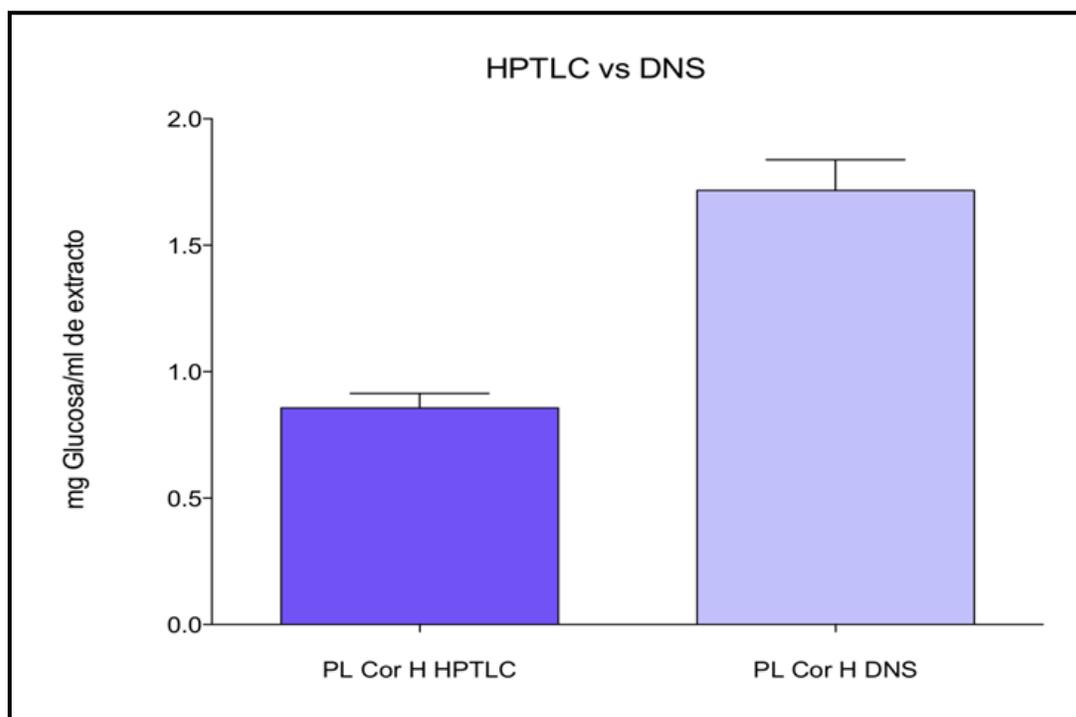
En los espectros de RMN (anexo 1) se observa una mezcla de azúcares en la región de 3 a 4 ppm y se determinaron partes importantes de las moléculas, como el grupo amino y el carbono H1 anomérico. Esta técnica sirve para brindar un panorama general de la composición de los extractos con los que se trabaja.

Cuantificación de azúcares por HPLTC del extracto Palo Loco cocido

Por medio de la obtención de la curva patrón se calculó la concentración de los azúcares (apéndice 4). En este caso se usó como referencia a la glucosa, por ser el azúcar más representativo.

Por este método de cuantificación se obtiene una concentración de glucosa de **0.85 mg de glucosa/mL de extracto**. Si se compara con la metodología de cuantificación por DNS, se observa una diferencia entre dichos valores, ya que la cantidad de azúcares reductores totales obtenida es de **1.72 mg de glucosa/mL de extracto**; sin embargo, la curva patrón obtenida por HPLTC nos indica un coeficiente de correlación de 0.8843 (anexo 2) y el coeficiente de correlación de la metodología por DNS es de 0.999 (anexo 4), por lo que podemos decir que la cuantificación por el método de DNS es más confiable.

En la gráfica 3 se comparan las dos metodologías de acuerdo a la concentración obtenida y se coloca la desviación estándar en cada una de ellas.



Gráfica 3. Cuantificación de azúcares por diferentes metodologías

FERMENTACIONES

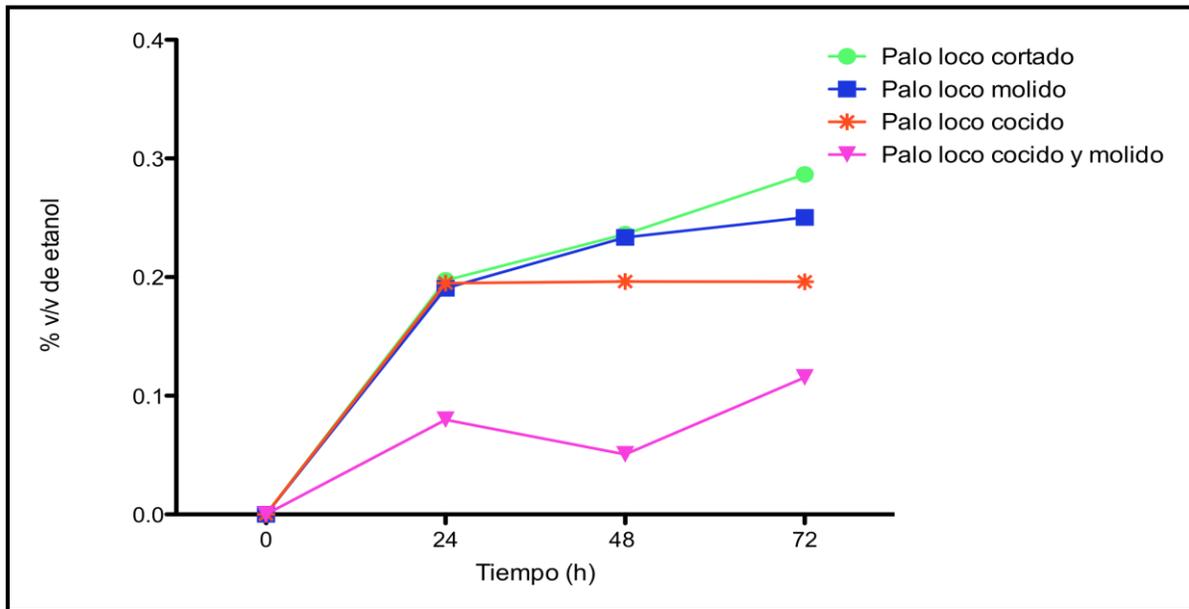
A continuación se muestran el rendimiento $Y = [\text{producto}] / [\text{sustrato}]$ obtenido en el proceso de fermentación (Tabla 4), el % v/v de etanol obtenido a las 24, 48 y 72 h para cada tratamiento (Tabla 5), así como la gráfica 4 en la que se observa el avance de las fermentaciones.

Tratamientos	Rendimiento [producto] / [sustrato]
Palo Loco cortado	0.58 g de etanol / g de azúcar
Palo Loco molido	0.83 g de etanol / g de azúcar
Palo Loco cocido	0.38 g de etanol / g de azúcar
Palo Loco cocido y molido	0.32 g de etanol / g de azúcar

Tabla 4. Rendimiento de etanol en las diferentes metodologías

Tratamientos	% v/v de etanol		
	24 h	48 h	72 h
Palo Loco cortado	0.1973 ± 0.0593	0.2363 ± 0.0867	0.2866 ± 0.1257
Palo Loco molido	0.1906 ± 0.0303	0.2334 ± 0.0248	0.2503 ± 0.0145
Palo Loco cocido	0.1949 ± 0.0496	0.1963 ± 0.1279	0.1960 ± 0.1121
Palo Loco cocido y molido	0.0797 ± 0.0651	0.0507 ± 0.0063	0.1155 ± 0.0171

Tabla 5. Porcentaje de etanol presente en extractos fermentados a las 24, 48 y 72 h (x ± DS)



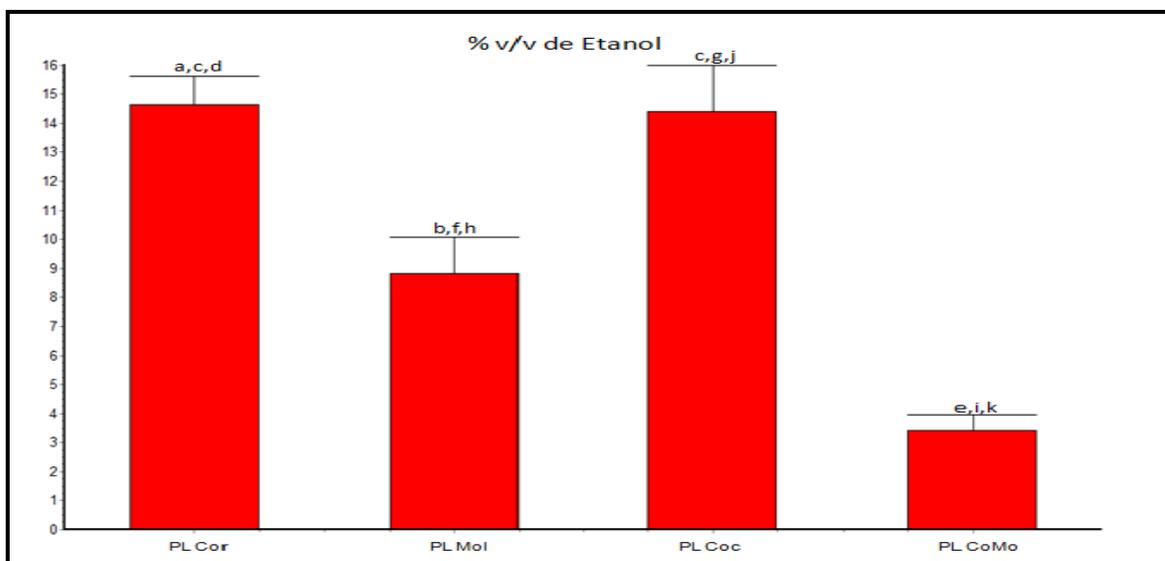
Gráfica 4. Representación gráfica del %v/v de etanol presente en extractos fermentados, **PLCo**r Palo loco cortado; **PLMo**l Palo Loco Molido; **PLCo**c Palo Loco Cocido; **PLCoMo** Palo Loco Cocido y Molido.

Destilación de etanol

En la tabla 6 y gráfica 5 se presentan los resultados de los extractos destilados. El valor está expresado en % V/V.

Tratamientos	Volumen de etanol destilado (mL)	% v/v de etanol presente en extracto destilado
Palo Loco cortado	0.5 mL	14.62 ± 0.982 ^{a,c,d}
Palo Loco molido	1.5 mL	8.83 ± 1.253 ^{b,f,h}
Palo Loco cocido	2.6 mL	14.41 ± 1.582 ^{c,g,j}
Palo Loco cocido y molido	0.9 mL	3.413 ± 0.547 ^{e,i,k}

Tabla 6. Porcentaje de etanol y volumen destilado (x ± DS); Análisis ANOVA, Prueba de Turkey n=3; Letras diferentes presentan diferencia significativa ^{a,b,f,g,h,i,j} (p<0.01) ; ^{d,e,j,k} (p<0.001)



Gráfica 5. Representación gráfica de la desviación estándar en el % v/v de etanol presente en los extractos destilados, **PLCor** Palo loco cortado; **PLMol** Palo Loco Molido; **PLCoc** Palo Loco Cocido; **PLCoMo** Palo Loco Cocido y Molido. A los datos se les realizó un análisis ANOVA y prueba de Turkey. **Diferentes letras presentan diferencia significativa** ^{a,b,f,g,h,i}($p < 0.01$) ; ^{d,e,j,k}($p < 0.001$) $n=3$ determinaciones por metodología

En tabla 4 se reportan los rendimientos de gramo de etanol / gramo de azúcar, lo que se observa es que la metodología que presentó un mayor rendimiento es la del Palo Loco molido (**0.83 g de etanol/ g de azúcar**). Esto puede ocurrir por que en el extracto se encuentra una mayor cantidad de azúcares fermentables los cuales están disponibles para la levadura generando así un mayor rendimiento, lo que indica que las condiciones que se usaron para llevar a cabo la preparación del extracto, la hidrólisis y la fermentación, resultaron ser las más adecuadas ya que el daño a los azúcares fue menor que en las otras metodologías.

En tabla 5 y gráfico 4 se observa que el % v/v aumenta a medida que transcurre la fermentación; es decir, que la producción de etanol es directamente proporcional, además, el % v/v esta directamente relacionado con la concentración y el volumen destilado, por lo que no deberían haberse presentado diferencias entre los valores obtenidos con la concentración. Sin embargo, en cuanto a % v/v la metodología Palo Loco cocido presenta un porcentaje mayor de etanol, lo que indica que los destilados tienen una menor cantidad de agua.

En tabla 6 y gráfico 5 se reporta el % v/v de etanol presente en los destilados, así como el volumen de etanol obtenido al final de la destilación. Lo que se observa en la tabla 6, es que la metodología Palo Loco molido es la que presentó un mayor volumen de etanol. Sin embargo, en cuanto a % solo presenta 8.83% lo que indica que quizá la destilación no fue la más apropiada ya que el extracto pudo contener una mayor cantidad de agua, generando así que se obtuviera un % menor. En la misma tabla se observa que las metodologías Palo Loco cocido y Palo Loco cortado se obtiene un mayor porcentaje 14.41% y 14.62% respectivamente, lo que indica que la concentración de etanol presente es mayor. Por lo que quizá la destilación es más apropiada, lo que provoca que se obtenga una menor cantidad de agua y una mayor cantidad de etanol. Es importante aclarar que el volumen de etanol reportado en mL, que se obtuvo al final de la destilación es el volumen total, ya que de los 250 mL de extracto que se pusieron a fermentar se obtuvo el volumen destilado para cada extracto presente en la tabla 6.

Se realizó un análisis estadístico y se deduce que todas las metodologías presentan diferencias significativas, por lo que podemos decir que aunque el % v/v o el volumen obtenido al final de la destilación no haya sido el más adecuado, se pueden usar las metodologías realizando los tratamientos adecuados según sea el método que se elija.

Por lo que los resultados aquí obtenidos no nos desalientan al contrario nos animan a seguir realizando este tipo de investigaciones ya que son importantes por que los biocombustibles se han perfilado como un recurso energético importante en los últimos años, por ejemplo; la producción mundial de bioetanol en 2006 fue de cerca de 51 mil millones de litros, un 35% del total. China y la India contribuyeron con un 11% de la producción mundial en 2006 [Nigam, *et col.*, 2010], y aunque México aun no perfila como productor de bioetanol, no debemos descartar la posibilidad de que pronto tenga que utilizar este recurso renovable, como una fuente de energía alterna a las gasolinas.

VIII) CONCLUSIONES

- ✓ Se obtuvo bioetanol a partir de *P. praecox* utilizando cuatro metodologías diferentes. De las cuales la que presenta un mayor rendimiento es *P.praecox molido* (0.83 g de etanol/ g de azúcar) volviendo a esta la más eficiente.
- ✓ En este trabajo la mejor metodología para cuantificación de azúcares en los extractos obtenidos fue por DNS (**ácido dinitrosalicílico**).
- ✓ La hidrólisis en todos los extractos favoreció la obtención de una mayor cantidad de azúcares reductores, permitiendo así un aumento en la cantidad de bioetanol después de la fermentación.
- ✓ La adición de sustratos durante la fermentación, ayudó a que se realizara en un menor tiempo y además esto permite la optimización de resultados en cuanto a obtención de etanol.
- ✓ La planta *P. praecox* se propone como una fuente de carbono para la obtención de bioetanol, ya que no se utiliza para la alimentación del ser humano. Además, es un recurso que se encuentra distribuido en la mayor parte del país y no es demandante en cuanto a requerimientos nutricionales o de clima, por lo que se vuelve un recurso viable.

IX) BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Ávila Zarraga Gustavo (et al), Química Orgánica: Experimentos con un enfoque ecológico, 2° Edición, México: UNAM, Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial, 2009, Pág. 100- 105

- ✓ Álvarez C. 2009. *Biocombustibles: desarrollo histórico- tecnológico, mercados actuales y comercio internacional*. Revista Economía Informa Edición Julio -Agosto No.359.
En:http://www.economia.unam.mx/publicaciones/econinforma/pdfs/359/04c_arlosalvarez.pdf (Consultada 20 de septiembre de 2010)

- ✓ Canizalez, L. M. J. 2001. *Hidrólisis de los residuos lignocelulósicos de una industria cervecera*. Tesis de grado en Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Orizaba, México. Pág.93

- ✓ Cabrera, S. L.; Gómez, A. A.; Martínez, A. y Quintero, R. 2000. *Biocombustibles a partir de recursos lignocelulósicos: estudio del caso, bagazo de caña en México*, Centro de Investigación en Biotecnología- UAEM, Instituto Mexicano del Petróleo, Instituto de Biotecnología- UNAM. Pág.21

- ✓ Cimpoiú C., Qualitative and Quantitative Analysis by Hyphenated (HP)TLC- FTIR Tecniqúe, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologiesw, 28: 1203–1213, 2005

- ✓ Flores Encarnación Pedro, La producción de bioetanol de maíz en México: retos y posibilidades, Tesis de Licenciatura, UNAM, México 2008.

- ✓ García Garibay Mariano, Quintero Ramírez Rodolfo, López-Munguía Canales Agustín, *Biología Alimentaria*, México Limusa 1993. Pág. 453-463
- ✓ Hari K. *Optimization of Simultaneous Saccharification and Fermentation for the Production of Ethanol from Lignocellulosic Biomass*. *Journal Agricultural Food Chemistry* 2000, 48, 1971-1976
- ✓ Juárez Gutiérrez Moisés, Vivanco Loyo Pilar, *Bases de diseño para planta productora de bioetanol a partir de sorgo y yuca*, Tesis de Licenciatura, UNAM, México 2009.
- ✓ Lorenz G. *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. *Journal Analytical Chemistry*. Vol. 31, No.3, March 1959, 426-428.
- ✓ Martínez, Máximo, *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*, Fondo de Cultura Económica, México, 1979, 1° Edición. Pág. 674.
- ✓ Mabbe WE, et al., *Biomass availability for lignocellulosic ethanol production*, *Biomass and Bioenergy* (2011), doi:10.1016/j.biombioe.2011.06.026
- ✓ Musalem, O. L. 2006. *Industria alimentaria vs Industria de biocombustibles*. *Revista Claridades Agropecuaria*. Ed. Noviembre No. 159. En: <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/marcos.asp?numero=159>
(Consultada: 9 de marzo de 2011)

- ✓ Musalem, O. L. 2006. *Etanol: un elemento reciente en la dinámica económica mundial*. Revista Claridades Agropecuaria. Ed. Noviembre No. 159. En: <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/marcos.asp?numero=159> (Consultada: 9 de marzo de 2011)
- ✓ Nigam P.S. et al col., *Produccion of liquid biofuels from renewable resource*, *Progress in Energy and Combustion Sciencie* 37 (2011) 52-68.
- ✓ N. S. Han, J. F. Robyt, *Separation and Detection of sugars and alditols on thin layer chormatograms*, *Carbohydrate Research* (1998). *Carbohydrate Reserch* 313. 135, 137.
- ✓ Rocha, P., *Bioteconología en plantas medicinales y aromáticas, II Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2008.
- ✓ Rojo y Rodríguez, *La flora del Pedregal de San Ángel*, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, México 2002, 1ª edición, Pág. 35
- ✓ Rzedowski, Jerzy, *Vegetación de México*, Editorial Limusa, México 1983, 2º Edición. Pág. 127, 248
- ✓ Smith E. John, *Bioteconología*, Editorial Acribia, Zaragoza, España 2006, Pág. 49-51, 95-109.
- ✓ *Técnicas de Análisis de Alimentos*, Departamento de alimentos y biotecnología, Facultad de Química, UNAM, 2009. Pág. 57,65.

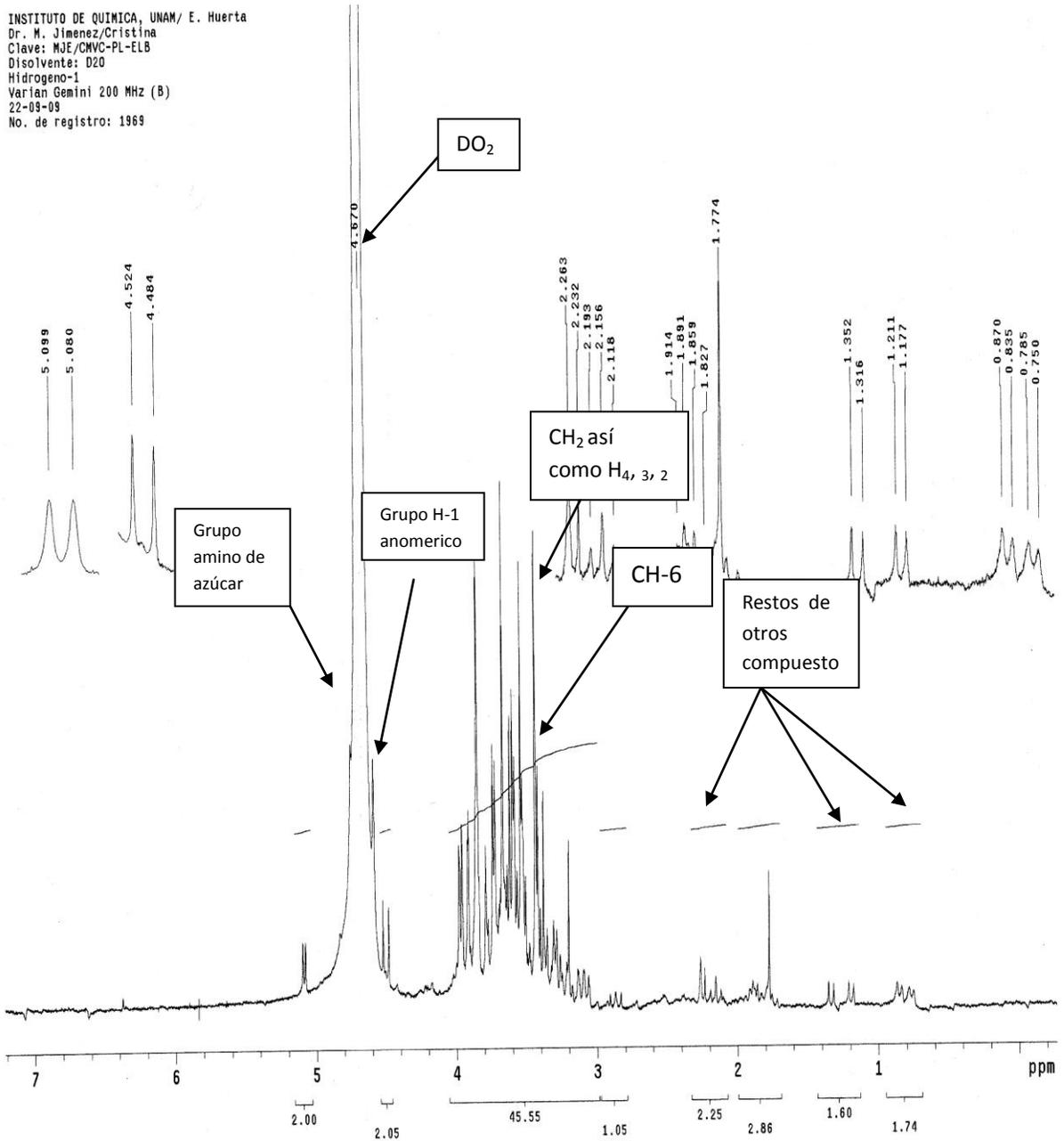
- ✓ Vázquez H.J. *Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas*. INGENIERÍA Investigación y Tecnología VIII. 4. 249-259, 200.

- ✓ Ward, Owen P. *Biotecnología de la fermentación: Principios, procesos y productos*, Zaragoza España, Editorial Acribia, 1989. Pág. 4-36, 73-84

- ✓ Zawawy W., Ibrahim M., Abdel-Fattah Y., Soliman N., *Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production*, Carbohydrate Polymers 84 (2011) 865-871

X) ANEXOS
ANEXO 1
Espectros RMN

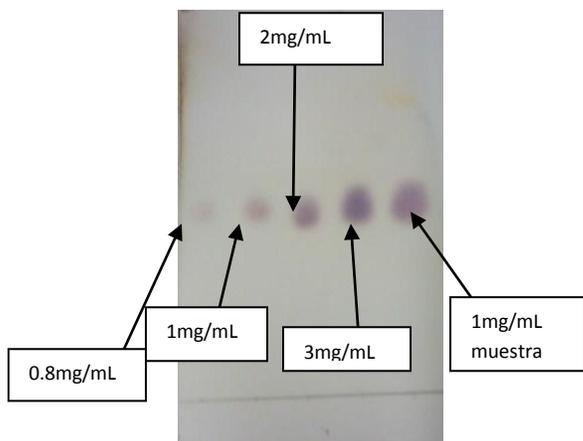
INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/ E. Huerta
 Dr. M. Jimenez/Cristina
 Clave: MJE/CWVC-PL-ELB
 Disolvente: D2O
 Hidrogeno-1
 Varian Gemini 200 MHz (B)
 22-09-08
 No. de registro: 1969



ANEXO 2

Curva patrón realizada para cuantificación de azúcares por HPTLC

Se realizó una placa con diferentes concentraciones de glucosa y se colocó 1 mg/mL de extracto. A continuación se muestra la placa realizada.

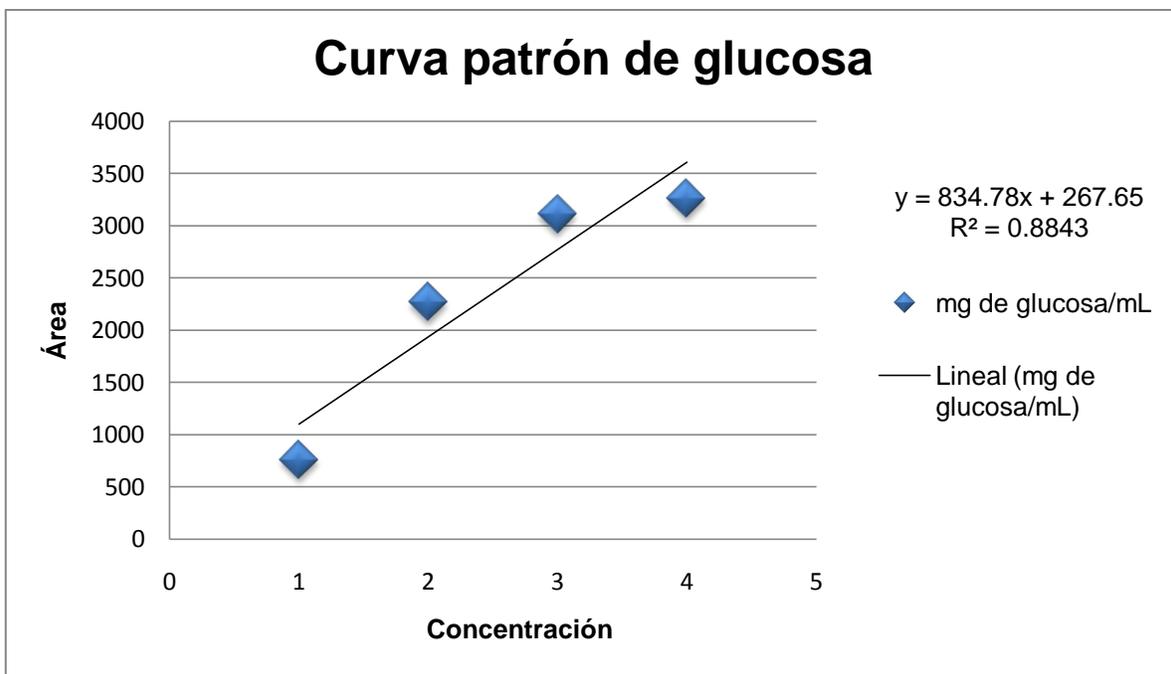


Placa de glucosa + muestra

Dicha placa se colocó en el aparato **CAMAG**, el cual nos dio valores de área, y con estos valores se realizó el cálculo de la curva patrón. Se extrapolaron los datos de las muestras para poder conocer la cantidad de azúcares disponibles.

A continuación se muestra una tabla en donde se presentan los valores de área obtenidos, así como el gráfico que representa la curva patrón con el cálculo respectivo para saber la cantidad de azúcar presente en la muestra.

Concentración	Area
0.8 mg/mL	766
1 mg/mL	2271.2
1.5mg/mL	3113.3
2mg/mL	3267.9



ANEXO 3

Se realizó la prueba de Azúcares Reductores por el Método de DNS por lo que se preparo el reactivo siguiendo la siguiente metodología:

Preparación reactivo DNS

Mezclar 80 mL de NaOH al 10% con 150 mL de agua destilada, agregar 150 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado. Calentar a 50°C y agitar constantemente. Agregar 5 g de DNS y agitar constantemente a 50°C., enfriar a temperatura ambiente y filtrar. Aforar a 500 mL. Guardarlo en frasco ámbar en lugar fresco y seco. [Análisis de alimentos, 2009]

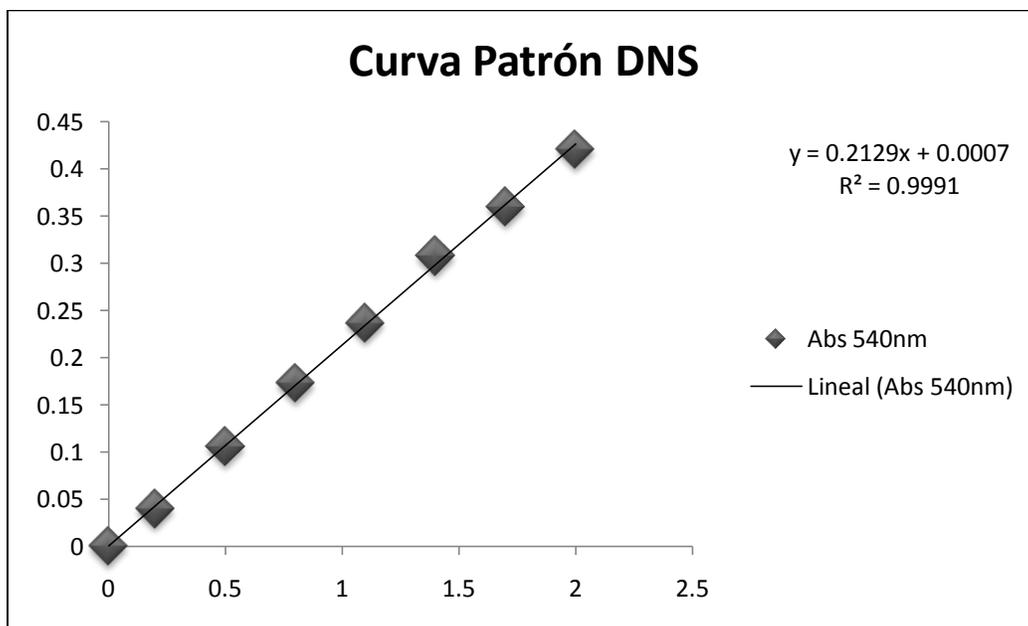
ANEXO 4

Curva Patrón DNS

Para la curva patrón se elaboró una solución stock de glucosa y de esta solución se prepararon siete soluciones con concentraciones diferentes, dichas concentraciones fueron [0, 0.2, 0.5, 0.8, 1.1, 1.4, 1.7, 2 mg de glucosa/ mL] de cada una de estas concentraciones se tomó 1 mL y se le adicionó 1 mL de reactivo DNS se calentó por 5 min, pasado el tiempo se adicionaron 10 mL de agua destilado y se leyó en un espectrofotómetro a 540 nm.

A continuación se muestra la tabla con los resultados obtenidos así como la gráfica.

[mg de glucosa/mL]	Abs 540 nm
0	0
0.2	0.04
0.5	0.106
0.8	0.173
1.1	0.237
1.4	0.308
1.7	0.36
2	0.421



APÉNDICE 1

Cálculo para pérdida de agua

$$\% \text{ de Agua perdido} = \frac{(\text{peso inicial de la planta (semana 1)}) - (\text{peso final de la planta (semana 3, 9, 16)})}{(\text{peso inicial de la planta (semana 1)})} \times 100$$

Ejemplo de cálculo

$$\% \text{ de Agua perdido} = \frac{(10.55\text{Kg de planta}) - (9.7\text{Kg de planta})}{(10.55\text{Kg de planta})} \times 100 = 8.05\% \text{ de Agua perdido}$$

APENDICE 2

Para ver la cantidad de agua que se pierde durante la liofilización, se realizó el siguiente cálculo:

Sabemos que se colocaron 10 mL de extracto, del cual su disolvente fue agua.

Después de la liofilización se pesó el compuesto y se obtuvieron 0.2033 g de extracto seco.

Para conocer el rendimiento se transforman los mL a gramos usando la densidad del agua que es de 1 g/mL.

$$10\text{mL de extracto} \left(\frac{1\text{g de extracto}}{1\text{mL de extracto}} \right) = 10\text{g de extracto}$$

Sabiendo que se colocan 10 g, éste sería nuestro 100%, y si solo obtenemos 0.2033 g, se usa la siguiente fórmula para conocer el rendimiento.

$$\left(\frac{\text{g de extracto final}}{\text{g de extracto inicial}} \right) \times 100 = \% \text{ de rendimiento de extracto seco}$$

$$\left(\frac{0.2033\text{g de extracto final}}{10\text{g de extracto inicial}} \right) \times 100 = 2.033\% \text{ de rendimiento de extracto seco}$$

Para saber el % de agua que se pierde, se usa la siguiente fórmula:

100% de agua – % de extracto seco obtenido = % de agua perdido

100% de agua – 2.033% de extracto seco obtenido = 97.96% de agua perdido

APENDICE 3

Ejemplo de cálculo de Rf, para la placa 4.

Para calcular el Rf se midió el frente del eluyente (en este caso 36 mm) y la distancia que recorre la sustancia (para el caso de la glucosa 16 mm).

Se utiliza la siguiente formula para conocer el Rf de cada una de las sustancias.

$$Rf = \frac{\text{distancia que recorre la sustancia}}{\text{distancia que recorre el eluyente}}$$

Para glucosa

$$Rf = \frac{18}{36} = 0.5$$

El Rf para la glucosa es de 0.5, lo que indica que este eluyente es ideal para la separación.

El Rf para la fructosa es de 0.4 lo que indica que el eluyente es de muy baja polaridad para la separación.

APENDICE 4

Cálculos de concentración de azúcares en el extracto Palo Loco Cocido por HPTLC

Una vez que se obtuvo la ecuación de la recta, solo se extrapolo el dato obtenido para la muestra (dicho valor será la Y en la ecuación: 975.6).

Entonces tenemos que $Y = m X + b$

$m = 834.78$; $b = 267.65$ y en este caso $y = 975.6$, por lo tanto solo despejamos en la ecuación la X, para poder saber la concentración en el extracto.

$$X = \frac{Y - b}{m}$$

$$X = \frac{975.6 - 267.65}{834.78} = 0.84 \text{ mg de } \frac{\text{glucosa}}{\text{mL de agua}}$$

Este valor nos indica que por cada mL de extracto Hidrolizado se tienen **0.84mg** de azúcar en este caso glucosa, lo que nos indica un 0.84% de azúcar presente en 1mg de muestra.