



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

“SÍLICE NANOESTRUCTURADA A PARTIR DE SÍLICE AMORFA DE  
CASCARILLA DE ARROZ MEDIANTE BIOPROCESOS”

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:  
FÍS. BÁRBARA MORENO MURGUÍA

TUTOR  
DR. VÍCTOR MANUEL CASTAÑO MENESES  
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

COMITÉ TUTOR  
DR. JORGE RAMÓN SOTO MERCADO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DR. JUAN BIBIANO MORALES MALACARA  
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

MÉXICO, D. F.

ENERO 2015



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.

## **Agradecimientos**

A CONACYT por el apoyo económico para realizar los estudios de Doctorado.

A los académicos y técnicos del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, en especial a mi tutor el Dr. Víctor Manuel Castaño Meneses por la dirección y apoyo para la realización de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutor el Dr. Jorge Ramón Soto Mercado, de quien recibí apoyo durante todo el proceso de posgrado y al Dr. Juan Bibiano Morales Malacara, por toda la ayuda y consejos para la parte biológica de este trabajo.

A la Dra. Gabriela Castaño Meneses, quien me ayudo a iniciar en el mundo de los colémbolos.

Agradezco a mis compañeros de posgrado de quienes aprendí y conviví, Mary Tere, Ivan, Nestor, Jesús, Xicoténcatl, Denisse, Pili, Héctor, Yoxkin, Lulu... y con especial aprecio a Astrid, Carlos, John, Diego y Luis Alejandro quienes siempre han estado cerca para apoyarme.

Y a mi familia, quien siempre ha creído en mí.

<b>Índice</b>	
1	Introducción ..... 7
2	Objetivos ..... 9
3	Justificación ..... 9
4	Fundamentos ..... 10
4.1	La cascarilla de arroz ..... 10
4.1.1	Características y composición de la cascarilla ..... 12
4.2	Lignocelulosa ..... 12
4.2.1	Celulosa ..... 13
4.2.2	Hemicelulosa ..... 13
4.2.3	Lignina ..... 14
4.2.4	Sílice..... 16
4.3	Tratamiento para la remoción de impurezas ..... 17
4.4	Tratamientos para la reducción de lignina..... 19
4.4.1	Tratamiento peróxido alcalino ..... 20
4.5	Colémbolos..... 21
4.5.1	Características generales..... 22
4.5.2	Folsomia candida..... 23
4.5.3	Extracción de colémbolos de la tierra ..... 25
4.5.4	Crecimiento en condiciones de laboratorio ..... 25
4.6	Técnicas de caracterización..... 26
4.6.1	Microscopía Electrónica de Barrido ..... 26
4.6.2	Espectrómetro de rayos X por dispersión de Energía (EDS) ..... 27
4.6.3	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR) ..... 28
4.6.4	Espectroscopia de Emisión Óptica por Plasma acoplado Inductivamente (ICP-OES) 30
4.6.5	Espectrofotómetro de absorción atómica ..... 31
4.6.6	Análisis de la fibra ..... 32
5	Metodología ..... 34
5.1	Cascarilla de arroz ..... 35
5.2	Tratamiento con ácido cítrico ..... 35
5.3	Tratamiento peróxido alcalino ..... 35
5.4	Cultivos de Colémbolos ..... 37

5.4.1	Reproducción de colémbolos en condiciones de laboratorio.....	37
5.4.2	Traslado y conteo de colémbolos.....	40
5.4.3	Identificación de la especie .....	42
5.4.4	Sustratos de cascarilla de arroz.....	42
5.4.5	Obtención de muestras de los cultivos .....	45
6	Caracterización.....	46
6.1	Análisis de composicional .....	46
	Análisis de impurezas .....	46
	Análisis de fibra .....	48
	Determinación de cenizas .....	49
6.2	Análisis estructural .....	50
	Análisis infrarrojo .....	50
6.3	Análisis de morfológico .....	50
	Análisis microscópico .....	50
7	Resultados y discusión .....	51
7.1	Cascarilla de arroz .....	51
7.2	Remoción de impurezas metálicas en la ceniza de cascarilla de arroz .....	52
7.3	Tratamiento peróxido alcalino .....	54
	7.3.1 Análisis de la fibra .....	54
7.4	Ceniza en la cascarilla de arroz .....	56
7.5	Análisis estructural .....	57
7.6	Cultivos de colémbolos .....	59
	7.6.1 Condiciones de temperatura y humedad.....	59
	7.6.2 Reproducción en los cultivos en condiciones de laboratorio .....	61
	7.6.3 Reproducción en los cultivos de cascarilla de arroz.....	65
	7.6.4 Extracción de muestras .....	70
	7.6.5 Caracterización de la sílice en los cultivos de colémbolos .....	72
8	Conclusiones y recomendaciones .....	75
9	Referencias.....	76



## Abstract

Although different methods have been studied to produce silica nanoparticles from rice husk, it is still necessary to study more environmentally friendly processes. Biological methods can be an alternative to obtain silica. This work shows a methodology for producing silica particles through bioprocesses by feeding springtails with treated rice husks. Initially, the husk was treated with a solution of 5% citric acid to reduce the metal impurities present. The total impurities were reduced from 1 to 0.14%. Subsequently, an alkaline peroxide treatment was performed to attack the chromophoric groups in the lignin and thus increase the degradability of material. The husk was subjected to a solution of 1% hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) at pH 11.5 controlled from 3 to 7 hours at room temperature, obtaining a reduction from the original composition of 8.78, 11.00, 10.99, 12.46 and 12.48% of the lignin, 4.36, 6.11, 5.87, 6.73 and even 7.43% of the hemicellulose, and 0.70, 1.47, 2.78, 3.18 to 4.25% of the cellulose respectively on ash-free basis. The treated material during 7 hours was used as substrate cultures springtails (*Folsomia candida*), which were maintained under conditions of high humidity (98%) for 30 days without any other food. More than 85% dry material degraded as compared to substrates untreated rice hulls was found. An average size of 135 nm in the silica particles present in the degraded material was obtained, 15nm less than particles of the material without biological treatment.

## Resumen

Si bien han surgido diversos métodos para producir nanopartículas sílice a partir de cascarilla de arroz, aun es necesario estudiar procesos más amigables con el ambiente. Los métodos biológicos pueden representar una alternativa para la obtención de la sílice. Este trabajo muestra una metodología para producir partículas de sílice a través de bioprocessos mediante la alimentación de colémbolos con cascarilla de arroz tratada. Inicialmente, la cascarilla fue tratada con una solución de ácido cítrico al 5% a fin de reducir las impurezas metálicas presentes. El total de impurezas se redujo de un de 1 a 0.14%. Posteriormente, se realizó un tratamiento peróxido alcalino a la cascarilla de arroz a fin de atacar los grupos cromóforos en la lignina y de este modo incrementar la degradabilidad del material. La cascarilla fue sometida a una solución de 1% de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a un pH 11.5 controlado de 3 a 7 horas a temperatura ambiente, con lo que se obtuvo una reducción respecto a la composición original de 8.78, 11.00, 10.99, 12.46 y 12.48% de la lignina, 4.36, 6.11, 5,87, 6,73 y hasta 7.43% de la hemicelulosa, y 0.70, 1.47, 2.78, 3.18 y hasta 4.25% de la celulosa, respectivamente, sobre una base libre de ceniza. El material tratado durante 7 horas fue empleado como sustrato de cultivos de colémbolos (*Folsomia candida*), los cuales fueron mantenidos bajo condiciones de alta humedad (98%) durante 30 días sin ningún otro tipo de alimento. Se encontró más de 85% de material degradado seco, en comparación con los sustratos de cascarilla de arroz sin tratar. Se obtuvo un tamaño promedio de 135 nm en las partículas de sílice presentes en el material degradado, 15nm menor a las partículas del material sin tratamiento biológico.

# 1 Introducción

El arroz (*Oryza sativa*) es el segundo cereal más producido en el mundo después del maíz (745 millones de toneladas de arroz con cáscara al año). Los granos de arroz están protegidos con una cáscara dura y no comestible, por lo que después de cultivado los granos limpios son descascarillados por métodos mecánicos, haciéndolos pasar a través de unos rodillos de goma que giran a diferente velocidad y dividen los granos en arroz pardo y cáscaras. (FAOSTAT 2015, Lampe et al. 2001)

La cáscara, comúnmente llamada cascarilla de arroz, es considerada un desecho ya que es un material difícil de degradar. Esto se debe a su alto contenido de lignina (20-25%), lo que le confiere un alto grado de resistencia a los ataques químicos y biológicos (Yu et al. 2009). Por esta razón, no puede ser usado como alimento de ganado, debido a que los microorganismos del estómago de los animales no son capaces de digerir esta matriz de fibras.

Bajo estas circunstancias algunos agricultores suelen quemar la cascarilla de arroz en el campo, debido a que su retiro incrementaría el costo de producción del cereal, lo que reincorpora nutrientes a la tierra como N, P, K y sílice amorfa, pero genera emisiones contaminantes, 14.05 CO, 880.48 CO<sub>2</sub>, 0.19 NO<sub>2</sub>, 1.38 NO, 2.31 NO<sub>x</sub>, 0.11 SO<sub>2</sub> g kg<sup>-1</sup> (Irfan et al. 2014). De manera alternativa, es incorporada directamente al suelo de cultivo o es dispuesta como desecho en los rellenos sanitarios, lo que genera emisiones de metano (Chungsangunsit et al. 2009). De modo que a fin de reincorporar nutrientes al suelo, pero al mismo tiempo reducir las emisiones, es necesario incorporar parcialmente los desechos a la tierra a fin de restituir nutrientes, y aprovechar el resto para aplicaciones industriales (Abril et al. 2009).

Las aplicaciones industriales de la cascarilla varían de acuerdo a su composición, la cual está determinada por el origen del cultivo. Es aprovechada para producir energía a partir de su combustión (Salanti et al. 2010). También se emplea como materia prima para la producción compuestos como carbón activado, sílice, silicón, xilitol, silicatos, entre otros (Forero et al. 2009, Salanti et al. 2010).

En particular, la sílice es un material inorgánico de gran importancia y es usada en una gran variedad de aplicaciones comerciales como resinas, tamices moleculares, soportes catalíticos, agente antiaglomerante en alimentos, relleno en polímeros así como aplicaciones biomédicas (Bansal et al. 2006).

De entre los compuestos de sílice, las nanopartículas son empleadas en sustratos electrónicos, materiales aislantes, sensores de humedad, materiales de construcción, por mencionar algunos (Tabatabaei et al. 2006). Las características requeridas para las nanopartículas varían dependiendo de su aplicación, sin embargo dos de las más importantes son las referentes a la uniformidad en su tamaño y un alto grado de pureza (Tabatabaei et al. 2006).

Uno de los métodos usados para sintetizar químicamente nanopartículas de sílice, es el proceso



sol-gel. La síntesis involucra la hidrólisis y condensación de alcóxidos metálicos ((Si(OR)<sub>4</sub>), por ejemplo el tetraetilortosilicato (TEOS, Si(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>) (Rahman and Padavettan 2012). Sin embargo, la síntesis química de los materiales basados en sílice puede ser relativamente costosa y dañina para el ambiente (Bansal et al. 2006).

Aunque este compuesto se encuentra en los minerales, como el cuarzo y piedra, y en las plantas como el bambú, arroz y cebada, la sílice usada en aplicaciones químicas es sintética (Voort and Vrancken 1995). Algunas especies de plantas acumulan sílice, que puede variar desde 1% a más del 10% (Rodrigues and Datnoff 2005). Las plantas absorben el silicio del suelo en forma de ácido silícico soluble (H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>), el cual es polimerizado y precipitado como sílice amorfa. Cuando muere la planta, la sílice regresa al suelo (Bansal et al. 2006).

Gran parte de la planta de arroz contiene sílice como un componente de las células o paredes celulares. Sin embargo, en la cascarilla es más abundante, donde puede representar alrededor de 20% del peso de la cáscara (Park et al. 2003). En consecuencia, la extracción de este compuesto ha sido estudiada desde el comienzo de los años 80's (Sun et al. 2001), por lo que han surgido diversos métodos para producir sílice.

Los procesos químicos generalmente consisten en una digestión con ácidos que se realiza antes o después de una calcinación en un rango de temperatura y tiempo determinados, con el fin de obtener diferentes tamaños y morfologías (Arcos, Macías Pinto, and Rodríguez Páez 2007; Chandrasekhar et al. 2003; Liou 2004). Estos procesos permiten controlar las características físicas del producto final y requieren generalmente poco tiempo (1-2 días). No obstante, estos métodos se basan en la combustión del material para la eliminación del material orgánico y modificación de las características físicas.

También han surgido métodos basados en procesos biológicos, aunque han sido poco estudiados. Entre ellos se encuentra el trabajo de Bansal (2006), donde se utilizó el hongo *Fusarium oxysporum* para producir nanopartículas cristalinas cuasi-esféricas de 2-6 nanómetros a temperatura ambiente y en el estudio de Estevez (2009), se produjo nanopartículas de sílice por medio de la biodigestión que lleva a cabo la lombriz *Californian-red* al ser alimentada con cascarilla de arroz, obteniendo partículas amorfas de 55 a 250 nm.

Aunque el empleo de los métodos biológicos permite realizar procesos a temperatura ambiente, aun es necesario emplear otros procesos químicos adicionales para producir las nanopartículas de sílice.

## 2 Objetivos

### Objetivo general

Producir partículas de sílice a través de bioprocesos mediante la alimentación de colémbolos con cascarilla de arroz.

### Objetivos particulares

Elaborar un proceso que permita a la cascarilla de arroz tener las características adecuadas para ser alimento de colémbolos (*Folsomia candida*) y al mismo tiempo evitar la solubilización de la sílice.

Determinar las características de material después de los procesos realizados.

Establecer los medios para el crecimiento óptimo de los colémbolos en condiciones de laboratorio.

Determinar las condiciones necesarias de la cascarilla de arroz donde se favorezcan el consumo de ésta por parte de los colémbolos, y al mismo tiempo proporcione un medio propicio para su desarrollo y facilite la obtención de excretas.

Analizar las excretas producidas por los colémbolos con el fin de caracterizar la sílice obtenida.

## 3 Justificación

La cascarilla de arroz es un residuo de la industria arrocera que es dispuesto en su mayor parte como desecho. Sin embargo, debido a su alto contenido de sílice, aproximadamente 20% del peso de la cascarilla (Yu et al. 2009), los procesos de extracción de este componente han sido investigados a través del tiempo. Existen diversas investigaciones sobre la producción de partículas de tamaño nanométrico a través de calcinaciones y digestión con ácidos, pero muy pocos trabajos que aborden el uso de bioprocesos para la obtención de nanopartículas.

A la fecha, no existen investigaciones referentes al uso de colémbolos para producir partículas de sílice a partir de la cascarilla de arroz. Sin embargo, dado que para el caso de las lombrices y hongos se han obtenido nanopartículas al emplear cascarilla de arroz, se espera que empleando colémbolos alimentados con cascarilla se obtenga en sus excretas partículas de sílice y que el tamaño de éstas, se encuentre en un rango intermedio (menor a 55nm) por tratarse de organismos mucho más pequeños que las lombrices de tierra.

La alimentación de los colémbolos es muy variada, pero consiste principalmente en restos de plantas, sin embargo puede modificarse según los alimentos a su alcance, y de acuerdo a la época del año, lo que supone una fácil adaptación a las condiciones del medio, haciendo factible que la

cascarilla de arroz pueda ser su único alimento.

## 4 Fundamentos

### 4.1 La cascarilla de arroz

La cascarilla constituye la parte externa de la semilla de arroz y se obtiene mediante el descascarillado del grano. Este material duro y fibroso, muchas veces es considerado como desecho, representa cerca del 20% en peso del grano de arroz.

Muchos de los desechos provenientes de los cultivos de alimentos, con alto contenido de fibra, son poco utilizados como materia prima para elaborar papel o como alimento para ganado. Esto se debe al bajo grado de digestibilidad, lo que dificulta tanto la elaboración de pulpas como la digestión en animales, debido gran parte al contenido de lignina y ceniza en estos materiales (Salanti et al. 2010).

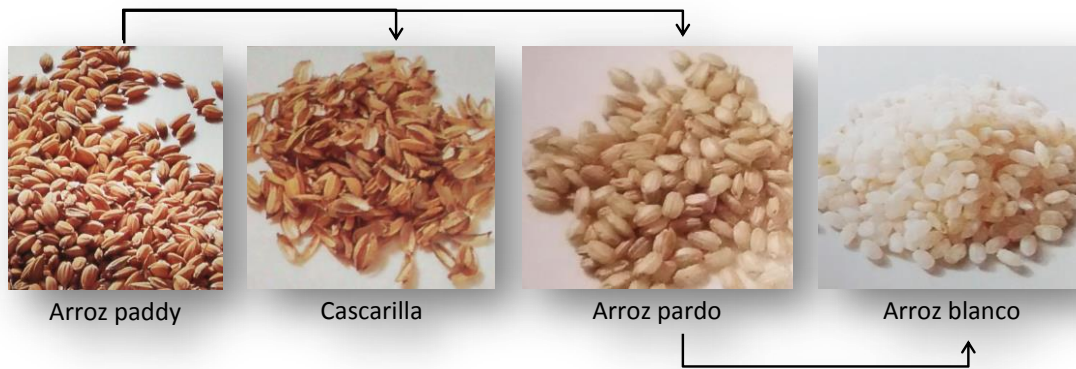
El arroz es el fruto de la planta *Oryza sativa* L. de origen asiático. Esta planta es una gramínea anual, de tallos redondos y huecos compuestos de nudos y entrenudos, hojas de lámina plana unidas al tallo por vaina y su inflorescencia es en panícula. El tamaño de la planta varía de 0.4m hasta más de 7.0m (CIAT 2005). Esta planta se cultiva en todas las áreas tropicales y subtropicales del mundo. Pertenece a la familia de las Gramíneas, a veces llamadas Poáceas (León 2000). En esta familia están incluidos todos los cereales (Sugden 1985).



**Figura 1** Planta de arroz (*Oryza sativa*) (www.japanfocus.org)

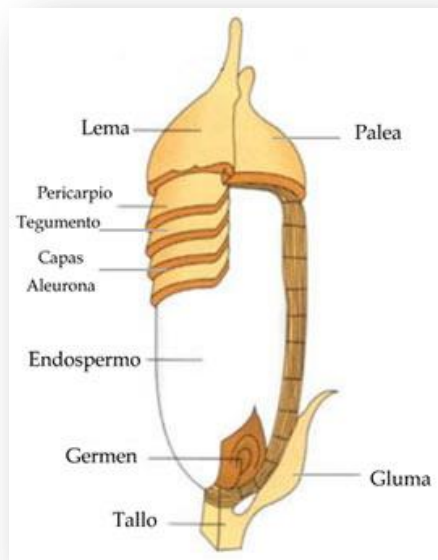
Desde el punto de vista comercial existen tres tipos de arroz: arroz bruto o paddy, arroz pardo o moreno y arroz blanco. El arroz paddy es el arroz sin descascarillar, como se presenta después de recolectar. El arroz pardo o moreno, es el que se obtiene por la eliminación de la cascarilla

mediante descascarillado o descorticado y el arroz pulido, también denominado arroz blanco, al que se le quita la mayor parte de las cubiertas externas o salvado de acuerdo al grado de molienda (Gil 2010).



**Figura 2** Nombre del arroz por etapa (Lampe et al. 2001)

El grano de arroz está formado por el pericarpio (epicarpio, mesocarpio y células transversales) y otra capa más profunda, la testa, que rodea el endospermo, la reserva energética de la semilla (Gil 2010).



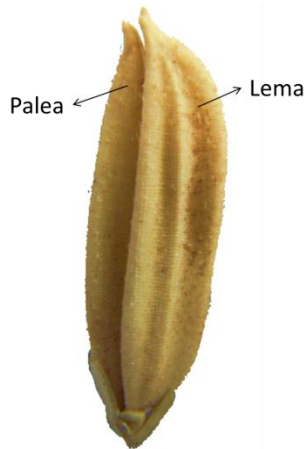
**Figura 3** Principales partes del grano de arroz (Lampe et al. 2001)

El arroz es uno de los alimentos más importantes en el mundo. Según la FAO, durante el 2013 se produjeron 745 millones de toneladas de arroz en el mundo, por lo que se generaron unos 149 millones de toneladas de cascarilla aproximadamente. En México se generaron 179 mil toneladas

de cascarilla de arroz aproximadamente. Por tanto se generan grandes cantidades de cascarilla como desecho agroindustrial que puede tener un valor agregado (Kalia, Kaith, and Inderjeet Kaur 2011). En la actualidad es empleada como combustible, sustrato para cultivos de plantas, como fuente de sílice, entre otros.

#### 4.1.1 Características y composición de la cascarilla

La cascarilla de arroz está conformada por la lema y la palea principalmente (Degiovanni, Martínez, and Motta 2010), como se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** Principales partes de la cascarilla de arroz

La cascarilla es un material resistente, duro, leñoso, abrasivo y tiene escaso valor nutritivo. Representa alrededor del 20% del peso del grano, posee una alta proporción de fibra (70%), cenizas ricas en sílice (20%), y otros orgánicos (Chandrasekhar et al. 2003; Salanti et al. 2010). La composición química general de la cascarilla consiste de celulosa (35-40%), hemicelulosa (15-20%), lignina (20-25%) y sílice (20%) (Yu et al. 2009).

Los principales componentes que forman la fibra de la cascarilla tales como celulosa, hemicelulosa y lignina, se encuentran en los materiales lignocelulósicos, los cuales son la fuente de biomasa más abundante en el mundo (Salanti et al. 2010).

#### 4.2 Lignocelulosa

La lignocelulosa es principal componente de la biomasa, constituye cerca de la mitad de la materia producida por fotosíntesis. Consiste de tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales se encuentran fuertemente entrelazados y unidos químicamente por enlaces covalentes y no covalentes (Pérez et al. 2002).

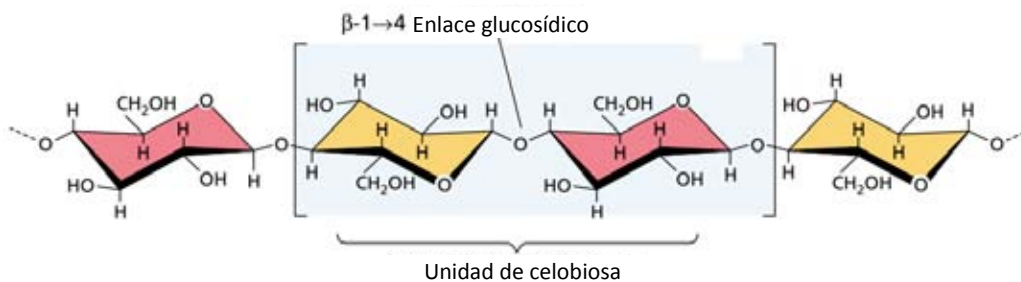
Las proporciones de estos polímeros varían de una especie de plantas a otra, incluso en una misma especie por la edad, estado de crecimiento, entre otros.

A continuación se exponen las principales características de cada uno de estos polímeros.

#### 4.2.1 Celulosa

La celulosa es la sustancia más importante de las paredes celulares vegetales. Es un polímero de carbohidratos formado por moléculas de glucosa (Sugden 1985).

Las cadenas de celulosa están formadas de unidades  $\beta$ -D-glucosa con enlaces (1  $\rightarrow$  4), que en conjunto forman microfibrillas, cuya longitud es indeterminada y varían tanto en grosor como en el grado de orden. Debido a la configuración espacial alternante de los enlaces glucosídicos que unen las unidades de glucosa, se considera que la unidad que se repite es la celobiosa, un disacárido formado por dos glucosas  $\beta$ -D-glucosa con enlaces (1  $\rightarrow$  4) (Taiz and Zeiger 2002).



**Figura 5.** Unidad estructural de la celulosa (Taiz and Zeiger 2002).

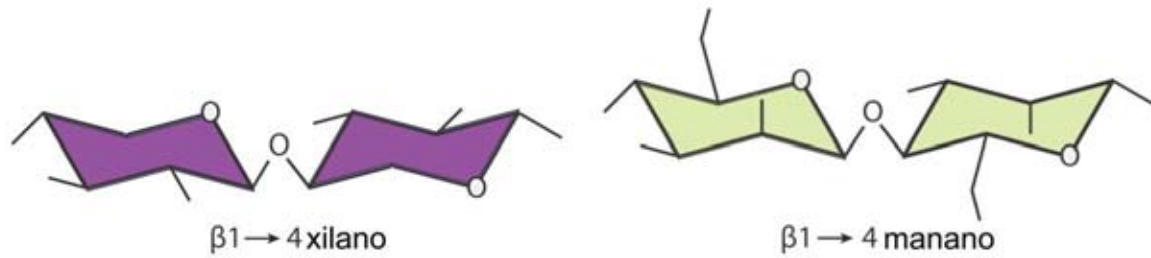
El conjunto de estas fibras, o microfibrilla, contiene tanto regiones cristalinas como regiones amorfas. En las zonas cristalinas, las cadenas de glucosa se encuentran ordenadas y unidas unas con otras por medio de enlaces no covalentes como puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Los enlaces no covalentes entre las cadenas de una microfibrilla le confieren a la celulosa una alta resistencia a la tensión.

La celulosa es insoluble, químicamente estable y relativamente inmune a ataques químicos y enzimáticos. Además, contribuye a la resistencia y estructura de la pared celular. Las unidades de glucosa que componen a la microfibrilla, están estrechamente alineadas y enlazadas unas con otras, formando un grupo altamente ordenado que no permite la entrada de agua y es menos accesible a ataques enzimáticos. Debido a estas características, la celulosa es muy estable, fuerte y resistente a la degradación (Taiz and Zeiger 2002).

#### 4.2.2 Hemicelulosa

Las hemicelulosas son un grupo heterogéneo de polisacáridos que se caracterizan por tener cadenas compuestas de glucosa, manosa y xilosa con enlaces  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4) (Scheller and Ulvskov 2010).

Este grupo se divide en cuatro clases generales de polisacáridos estructuralmente diferentes: Xiloglucanos, Xilanos, Mananos y  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3, 1  $\rightarrow$  4)-glucanos (Ebringerová and Hromádková 2002; Scheller and Ulvskov 2010). El tipo y cantidad de estos polisacáridos, varía de una especie a otra, incluso en diferentes tejidos de una misma planta (Taiz and Zeiger 2002).



**Figura 6.** Ejemplos de tipos de hemicelulosa (Scheller and Ulvskov 2010).

En la mayoría de la literatura, se utiliza el término común de *hemicelulosa* para referirse a este grupo de polisacáridos con las características anteriormente mencionadas.

Las hemicelulosas se unen a la superficie de la celulosa (Taiz and Zeiger 2002). La celulosa y la hemicelulosa se enlazan por puentes de hidrógeno (Bidlack, Malone, and Benson 1992).

### 4.2.3 Lignina

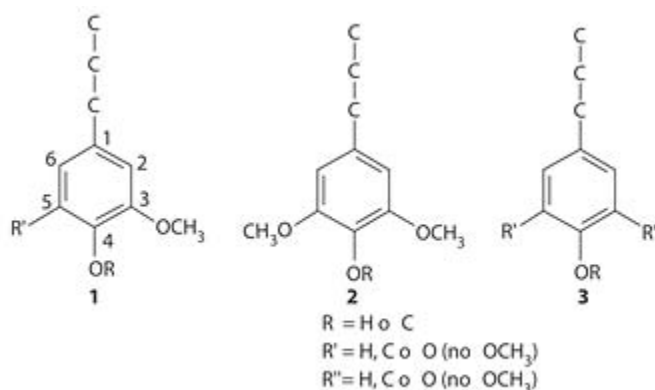
Después de la celulosa, la lignina es el compuesto orgánico más abundante en las plantas. Este polímero tridimensional está compuesto de unidades de fenilpropano C6-C3. Estas unidades consisten en anillos aromáticos de benceno con una cadena de tres carbonos. La estructura precisa de la lignina es desconocida debido a la dificultad de extraer la lignina de las plantas, ya que se encuentra enlazada covalentemente a la celulosa y otros polisacáridos de la pared celular (Peña and Rojas 2006; Taiz and Zeiger 2002).

La lignina no dispone de grupos polares, lo que le da un carácter hidrófobo. Es una sustancia bastante inerte, existiendo escasos organismos que se alimenten de materiales con alto contenido de lignina (Peña and Rojas 2006).

Gran parte del soporte estructural de la lignicelulosa es debido a la lignina. Además, este polímero provee impermeabilidad y resistencia contra el ataque microbiano. Por su carácter hidrófobo no es soluble en agua y en conjunto, todas estas características hacen que la degradación de la lignina

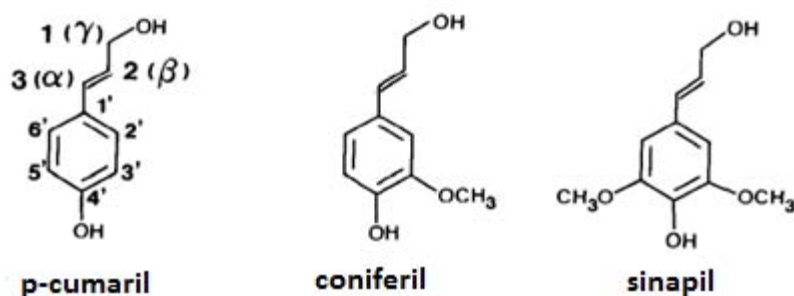
sea difícil. Asimismo, la lignina rodea las microfibrillas sirviendo de unión entre éstas y como una barrera física (Peña and Rojas 2006).

Las principales unidades de fenilpropano que pueden encontrarse en la lignina son del tipo: guayacilpropano, siringilpropano y p-hidroxifenilpropano. Las estructuras generales de estas unidades se muestran en la Figura 7. Sus proporciones varían dependiendo del origen botánico de la lignina (Brunow and Lundquist 2010).



**Figura 7.** Principales unidades de fenilpropano que pueden encontrarse en la lignina. Guayacilpropano (1), siringilpropano (2) y p-hidroxifenilpropano (3) (Brunow and Lundquist 2010).

La biosíntesis de estas unidades procede vía una polimerización oxidativa de tres precursores primarios: los alcoholes p-hidroxicinamil o alcoholes fenilpropanoides: coniferil, cumaril y sinapil (Heitner, Dimmel, and Schmidt 2010; Taiz and Zeiger 2002).



**Figura 8.** Precursores de las unidades fenilpropano en la lignina (Lewis and Yamamoto 1990).

En la lignina se encuentran frecuentemente múltiples enlaces C-C y C-O-C en cada unidad de alcohol fenilpropano, resultando en una compleja estructura en tres dimensiones. A diferencia de otros polímeros, la lignina no parece estar constituida por unidades repetidas.

Este complejo polímero, se encuentra en las paredes celulares de varios tipos de tejido de soporte. Como se había mencionado, además de proveer soporte mecánico, la lignina tiene funciones



significativas de protección. Además, reduce la digestibilidad de estos compuestos. La lignificación bloquea el crecimiento de patógenos y es una respuesta a la infección o lesiones (Taiz and Zeiger 2002).

Los enlaces entre los polisacáridos y la lignina son complejos y aun se debaten. Se ha encontrado que existen enlaces covalentes formados entre la lignina y la hemicelulosas. Las hemicelulosas se enlazan por medio de enlaces ester y eter a la lignina, pero también por medio de los ácidos ferúlico y *p*-cumárico (Bidlack et al. 1992; Sun 2010).

#### **4.2.4 Sílice**

La sílice ( $SiO_2$ ) es un compuesto formado por silicio y oxígeno. Comprende una amplia clase de productos con la fórmula general  $SiO_2$  o  $SiO_2 \cdot nH_2O$ . Este compuesto puede ser de origen biológico o sintético. La sílice de origen natural se encuentra en los minerales, como el cuarzo y el sílex, y en las plantas como el bambú, arroz y cebada (Voort and Vrancken 1995).

Dependiendo de la especie, el contenido de silicio acumulado en la biomasa puede variar desde 1% a más del 10%. Se considera que una especie es acumuladora de *Si* cuando la concentración supera el 1% (Rodrigues and Datnoff 2005).

Las plantas absorben el silicio del suelo como ácido monosilícico, también llamado ácido ortosilícico  $H_2SiO_4$ , tanto por difusión como por transpiración inducida por la absorción de la raíz. El ácido monosilícico es polimerizado y precipitado como sílice amorfa hidratada  $SiO_2 \cdot nH_2O$  tanto en las paredes de las células, los espacios intercelulares de las raíces y células de las hojas (Bansal et al. 2006; Rodrigues and Datnoff 2005).

Cuando la planta muere, la sílice regresa al suelo. El ciclo biológico de la sílice en el suelo también se presenta a través de actividades microbianas que involucran hongos, bacterias y actinomicetos. Tanto las plantas como los microbios contribuyen considerablemente en el ciclo global del silicio, a través de su interacción con los minerales del suelo (Bansal et al. 2005).

#### ***Sílice en la cascarilla de arroz***

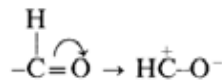
El alto contenido de sílice en el grano de arroz se encuentra en su cascarilla, el cual varía de 8.7 a 12.1% (Bansal et al. 2005). Se estima que un cultivo de arroz que genera un rendimiento total de 5t/ha removerá de un 0.23 a 0.47 toneladas de Si/ha del suelo (Rodrigues and Datnoff 2005).

La sílice está presente como un componente de las paredes celulares de prácticamente todas las partes aéreas de la planta de arroz, pero es más abundante en la cascarilla. La sílice se encuentra principalmente en la epidermis de la cascarilla de arroz, pero también puede encontrarse en los

espacios entre los tejidos epidérmicos. Al parecer la sílice se encuentra altamente concentrada en las protuberancias y las regiones entre las protuberancias de la cascarilla (Park et al. 2003; Patel, Karera, and Prasanna 1987). La sílice tiene la función de incrementar el grado de resistencia contra patógenos, pero también puede inhibir la degradabilidad (Sun et al. 2001).

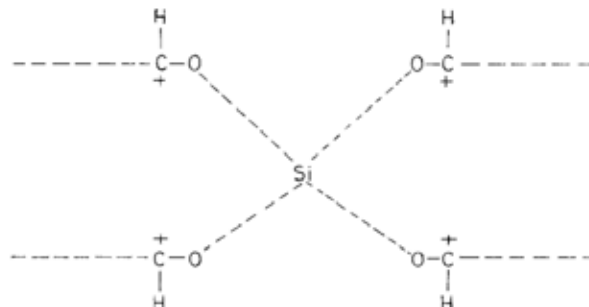
Los granos de sílice pueden ser visibles como partículas discretas después calcinar la cascarilla. Estas partículas tienen una gran variación en tamaño, que van desde menos de 100nm hasta 1µm. Las partículas más grandes parecen estar formadas por la agregación de partículas más pequeñas (Park et al. 2003).

Parte de la sílice puede estar ligada a los polisacáridos formando algunos enlaces cortos entre el silicio y los compuestos orgánicos. Las cascarillas desilificadas contienen cerca de un 2.5% de sílice. A fin de respaldar estos enlaces del silicio con moléculas orgánicas, se debe considerar la estructura de los compuestos orgánicos presentes en la cascarilla de arroz. La celulosa, el mayor constituyente de la cascarilla de arroz, siendo un polisacárido no parece poseer una considerable propiedad de enlazarse. Por otro lado, la lignina, es fundamentalmente inerte y por tanto no se espera que sea adecuada para enlazarse. Finalmente, los cuatro materiales orgánicos remanentes en la cascarilla de arroz son aldehídos (monosacáridos) lo cuales se convierten en polares debido al efecto electromagnético, como se muestra en el esquema de la Figura 9 (Genieva et al. 2008).



**Figura 9** Conversión de enlaces debido al efecto electromagnético.

Los posibles enlaces del silicio con las cuatro unidades de aldehído se muestran en la Figura 10.



**Figura 10.** Posibles enlaces del silicio con la fibra

Considerando que las moléculas de monosacáridos reaccionan con un átomo de silicio, solo un 2.88% se encuentra enlazado, de modo que la mayor parte de la sílice se encuentra libre (Patel et al. 1987).

### 4.3 Tratamiento para la remoción de impurezas

La cascarilla de arroz contiene cerca del 1% en peso de impurezas metálicas (Umeda and Kondoh 2008b). Estas impurezas persisten ante la mayoría de los procedimientos empleados en la producción de sílice a partir de la cascarilla de arroz, por lo que si se desea obtener un producto de alta pureza, estas deben ser removidas (Chandrasekhar, Pramada, and Praveen 2005).

Los mayoría de los métodos empleados para remover impurezas consisten en tratar la cascarilla con una solución de ácido clorhídrico, sulfúrico o nítrico (Chandrasekhar et al. 2005). Estos ácidos son muy eficientes para remover las impurezas metálicas presentes en la cascarilla, sin embargo los residuos del tratamiento son dañinos para el medio ambiente (Umeda, Imai, and Kondoh 2009). Una alternativa es utilizar ácidos orgánicos, como el ácido cítrico, aunque no son tan efectivos como los orgánicos pueden remover la mayor parte las impurezas presentes en la cascarilla de arroz (Chandrasekhar et al. 2005; Umeda and Kondoh 2008b).

Para remover las impurezas con ácido cítrico, se realiza un proceso similar al empleado con los ácidos inorgánicos. La cascarilla es colocada en la solución de ácido cítrico por 15 minutos en un baño térmico a 50°C. Posteriormente la muestra es filtrada y enjuagada a fin remover el ácido del material. Con el empleo de este ácido carboxílico se reducen considerablemente el número de enjuagues necesarios para remover el reactivo de las muestras, resultando en un menor consumo de agua durante el tratamiento (Umeda and Kondoh 2008a).

La concentración de la solución que garantiza una eficiente remoción de la mayoría de metales, corresponde a un 5% en peso de ácido cítrico (Umeda and Kondoh 2008a).

Muchos iones metálicos reaccionan con dadores de pares de electrones para formar compuestos de coordinación o complejos. La especie dadora, o ligando, debe tener por lo menos un par de electrones sin compartir disponible para la formación del enlace. El agua es un ligando común. Muchos iones metálicos en disolución acuosa existen en realidad como complejos hidratados.

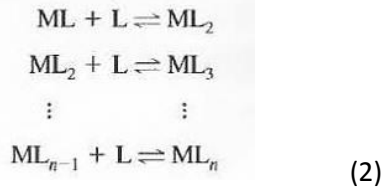
El número de enlaces covalentes que tiende a formar un ion con los dadores de electrones es su número de coordinación, cuyos valores típicos son 2, 4 ó 6. Las especies que se forman como resultado de la coordinación pueden ser positivas, neutras o negativas.

Un quelato se produce cuando un ion metálico se coordina con dos o más grupos dadores de un mismo ligando para formar un anillo heterocíclico de cinco o seis eslabones.

En las reacciones de complejos, un ion metálico M reacciona con un ligando L para formar un complejo ML, de manera general (1):



Las reacciones de formación de complejos ocurren por etapas, habitualmente la reacción anterior va seguida de más reacciones (2):



Los complejos formados son solubles en disolución. Sin embargo, es posible que la adición de ligandos a un ion metálico de como resultado especies insolubles.

Los agentes complejantes orgánicos, son reactivos particularmente útiles en la precipitación de metales. Los reactivos orgánicos más útiles forman complejos quelato con iones metálicos. De modo que pueden usarse para convertir iones metálicos en formas que puedan extraerse fácilmente del agua en fase orgánica inmisible (Skoog, West, and Holler 1997).

En particular, el uso de ácido cítrico es efectivo debido a la reacción de quelación entre los grupos carboxilos y las impurezas metálicas contenidas en las cascarillas, resultando en la remoción de esas impurezas como complejos metálicos durante el tratamiento. La reacción de quelación ocurre con grupos carboxilo  $-COOH$  y los elementos metálicos (Umeda and Kondoh 2010).

#### 4.4 Tratamientos para la reducción de lignina

La cascarilla de arroz tiene un bajo grado de digestibilidad, por lo que es necesario realizar un proceso que permita modificar la estructura de las fibras a fin de obtener un material apto para el consumo de organismos. Es preciso que el tratamiento permita aumentar la digestibilidad del material, manteniendo la integridad del material y evitando la disolución de la sílice, objeto de interés.

La lignina, uno de los componentes orgánicos de la cascarilla, evita la degradación de la celulosa sobre todo al actuar como una barrera física. Por una parte, en materiales lignocelulósicos, la velocidad y el grado de degradación de la celulosa está inversamente relacionada con el contenido de lignina, pero incluso cuando los niveles de lignina son bajos, la hidrólisis de la celulosa puede ser limitada por las propiedades físicas de las microfibrillas. Esto se debe a los enlaces entre las cadenas de celulosa en las regiones cristalinas.

Para poder tener acceso a la degradación de la celulosa, es necesario realizar un tratamiento previo. Este proceso tienen como objetivo incrementar el valor nutritivo, o bien la calidad de la pulpa, por medio de tratamientos químicos, físicos y enzimáticos para remover lignina y disminuir la cristalinidad de la celulosa. Algunos de los procesos para poder lograr estos objetivos son la autohidrólisis, cocción alcalina y explosión de vapor, sin embargo, requieren una gran cantidad de energía en forma de calor y tienden a generar productos tóxicos. Otra desventaja que suelen presentar algunos tratamientos es la gran pérdida de hemicelulosa con los productos de oxidación.

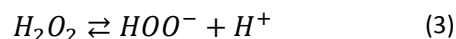
De entre los tratamientos químicos, los tratamientos oxidativos usados comúnmente en el blanqueo de pulpas mecánicas, alteran la estructura de los cromóforos a grupos funcionales no

coloreados de lignina, pero sin remover grandes cantidad de este componente. Estos procesos emplean como agentes oxidativos los peróxidos (Leary and Schmidt 2010).

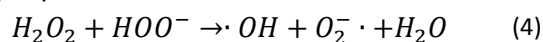
#### 4.4.1 Tratamiento peróxido alcalino

El peróxido de hidrógeno ha sido ampliamente usado como blanqueador de pulpa y papel. Es un oxidante medio y tiene su más alta eficiencia cuando la reacción se realiza en un medio alcalino. Su principal modo de reacción es el ataque nucleofílico por el anión peróxido en los átomos de carbono con deficiencia electrónica en la lignina.

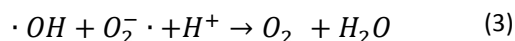
La acción blanqueadora del peróxido se atribuye al anión hidroperóxido ( $\text{HOO}^-$ ), el cual predomina en condiciones alcalinas y es el responsable de eliminar los grupos cromóforos de la lignina (Sun 2000a). Esto se lleva a cabo, debido a que en un medio alcalino el peróxido de hidrógeno se disocia para formar el anión hidroxiperoxido ( $\text{HOO}^-$ ) con un pKa de 11.6 (Gould 1985b). En la ecuación 1 se muestra la descomposición del peróxido en medio alcalino:



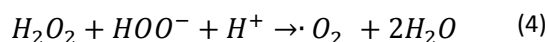
El anión hidroperóxido puede reaccionar con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  no disociado para formar radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) altamente reactivos y superóxidos:



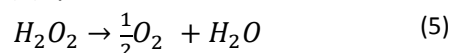
Los productos anteriores reaccionan de la siguiente manera:



De acuerdo a las ecuaciones 2 y 3, resulta:



Y usando la disociación de peróxido (1) queda:



En ausencia de otros reactantes, el oxígeno obtenido corresponde a la mitad de la cantidad molar del  $\text{H}_2\text{O}_2$  inicial. De manera que, si en presencia de lignina la cantidad de oxígeno es menor, quiere decir que algunos de los reactivos intermediarios formados durante la descomposición han sido incorporados en los productos oxidados de la lignina. Y dado que las investigaciones muestran que la cantidad de oxígeno que desprende la reacción es menor, se corrobora la reacción de los productos intermediarios con la lignina. Además, se ha encontrado un máximo de delignificación a un pH de 11.5, un pH muy cercano al óptimo de la reacción (4) (Gould 1985b).

El anión hidroperóxido formado durante la descomposición del peróxido, permite la eliminación de grupos cromóforos en la lignina sin remover gran cantidad de este polímero y preservando la integridad de la cáscara (Gellerstedt 2010; Kerley et al. 1987). Este anión es un fuerte nucleófilo que preferencialmente ataca los grupos etileno y carbonilos presentes en la lignina. Para la paja de

trigo y otros residuos agrícolas, se ha conseguido una remoción de lignina de cerca del 60% empleando un pH inicial de 11.5.

Aunque la delignificación es fuertemente dependiente del pH de la reacción, generalmente se considera que no es necesario regularlo, a pesar de que la reacción aumenta de 11.5 a 13.0 (Fang, Sun, and Tomkinson 2000; Sun 2000a). Esta preferencia se debe a que conforme la reacción se vuelve más alcalina, más hemicelulosa se disuelve y habitualmente solo la celulosa es el componente de interés (Fang et al. 2000). Por otro lado, en dichas condiciones, también se remueve gran cantidad de sílice (Sun et al. 2001).

Por otro lado, se ha encontrado que en las reacciones donde el pH no es controlado, la mayor parte de la lignina se solubiliza en las primeras 6 horas, cuando el pH de la reacción es menor a 11.8 (Gould 1985a). De modo que la estricta regulación de pH de la reacción a 11.5 podría reducir la solubilización de hemicelulosa y disminuir la concentración de la lignina en la pared celular (Kerley et al. 1987). Es decir, se podría promover el ataque específico de algunos enlaces de la lignina, evitando perder el resto de los componentes de la pared celular.

## **4.5 Colémbolos**

Las primeras etapas del proceso de transformación de los residuos orgánicos son llevadas a cabo por la fauna edáfica, que fracciona y reduce de tamaño los restos, los mezcla con la fracción mineral y los transporta de un lugar a otro. Las etapas subsecuentes son realizadas por los seres endo y exoenzimáticos de las bacterias, actinomicetes, hongos y otros microorganismos que viven en el suelo (Labrador 2001).

Dentro de la fauna edáfica se encuentran los colémbolos, uno de los artrópodos más numerosos de la Tierra (Fountain and Hopkin 2005; Labrador 2001). Los colémbolos son una parte integral de los ecosistemas del suelo y son vulnerables a los efectos de la contaminación. Su abundancia y diversidad han sido usados para evaluar el impacto ambiental de diversos contaminantes (Fountain and Hopkin 2005).

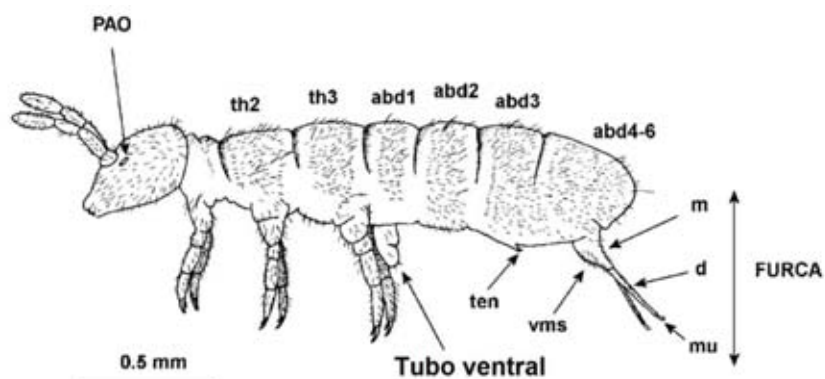
Los colémbolos, pueden ser encontrados en una gran variedad de hábitats, su alimentación es muy variada dependiendo de la especie, de las condiciones naturales en las que se encuentren y de la época del año (Ke and Scheu 2008; Rusek 1998; Thimm et al. 1998). Estos organismos desempeñan un papel importante en la descomposición de la materia orgánica, formando la microestructura del suelo (Rusek 1998), debido a que mejoran el flujo de nutrientes por fragmentación y movilización de la materia orgánica (Kreuzer et al. 2004).

#### 4.5.1 Características generales

Los colémbolos son animales pequeños, la mayoría son de unos cuantos milímetros de largo. Se han descrito aproximadamente 6500 especies de colémbolos, aunque hay muchas especies aun sin descubrir. Se encuentran distribuidos por todo el mundo, siendo abundantes en la mayoría de los ecosistemas terrestres tanto en el suelo como en la hojarasca. Normalmente se encuentran entre  $10^4$  y  $10^5$  organismos por metro cuadrado (Hopkin 2002).

Una de las características llamativas de los colémbolos es la fúrcula, un órgano que les permite realizar grandes saltos en comparación de su tamaño. La furca está bien desarrollada en la mayoría de los colémbolos que viven en la superficie, sin embargo en algunas especies que viven toda su vida en el suelo es muy reducida o incluso ausente del todo. Las especies con una furca larga tienden a hacer saltos simples, pero muy largos, los de furca reducida realizan varios saltos pequeños para alcanzar la misma distancia. Esta característica la usan para escapar de depredadores (Hopkin 1997, 2002).

Aunque las especies de colémbolos tienen características muy diversas, todos los colémbolos tienen un tubo ventral llamado colóforo. Este órgano consiste en un saco reversible que se deriva del primer segmento abdominal. Es muy importante en el balance de fluidos pero también funciona como un apéndice pegajoso que permite a los colémbolos adherirse a superficies resbaladizas (Hopkin 2002).



**Figura 11** Esquema y partes de *F. candida*. Tomado de (Fountain and Hopkin 2005)

A pesar de su tamaño, los colémbolos son muy importantes en la estructura de los suelos (Hopkin 2002). La actividad de colémbolos promueve el proceso de la descomposición en la tierra. Esto ocurre tanto directamente a través de su alimentación de vegetación muerta e hifas de hongos como indirectamente estimulando el crecimiento del microbios involucrados en la descomposición (Fountain and Hopkin 2005; Hopkin 1997).

De entre las variadas especies de colémbolos, la especie *Folsomia candida*, utilizada en este trabajo, es una de las especies más estudiadas, es fácil de conseguir en el mercado y relativamente fácil de cultivar. Es un artrópodo ampliamente encontrado en los suelos de todo el mundo.

#### 4.5.2 *Folsomia candida*

*Folsomia* es un género con más de 100 especies descritas, incluye especies de la familia Isotomidae que tiene una fúrcula bien desarrollada, y un abdomen con los tres segmentos posteriores fusionados. En particular, la especie *Folsomia candida* (*F. candida*) es una de las especies de colémbolos más estudiadas, ya que ha sido usada extensamente como modelo en diferentes estudios. Esta especie es considerada una especie errante, porque ha sido llevada alrededor del mundo en macetas y suelo. Por esta razón su ubicación geográfica original es difícil de determinar (Fountain and Hopkin 2005; Hopkin 1997). En la Figura 12 se representa su distribución geográfica.



**Figura 12** Distribución geográfica de la especie *F. candida* (Krogh et al. 2009)

En la Tabla 1 se muestra la taxonomía de la especie. Como se observa, aunque no pertenece a los insectos, es muy común que se considere dentro de esa Clase.

<b>Categorías taxonómicas</b>	
<i>Kingdom</i>	Animalia
<i>Subkingdom</i>	Bilateria
<i>Infrakingdom</i>	Protostomia
<i>Superphylum</i>	Ecdysozoa
<i>Phylum</i>	Arthropoda
<i>Subphylum</i>	Hexapoda
<i>Class</i>	Collembola
<i>Order</i>	Collembola
<i>Suborder</i>	Entomobryomorpha
<i>Superfamily</i>	Isotomoidea
<i>Family</i>	Isotomidae
<i>Subfamily</i>	Proisotominae



*Genus* Folsomia Willem, 1902

*Species* **Folsomia candida Willem, 1902**

**Tabla 1** Taxonomía de la especie *Folsomia candida* (ITS n.d.)

### ***Características de la especie***

Las especies tienen una longitud de 1.5 a 3.0 mm en su madurez, son blancas o ligeramente amarillentas y no tienen órganos visuales. Como otros colémbolos, la *F. candida* tiene un tubo ventral que interviene en el intercambio de fluidos con el exterior.

La población de *F. candida* consiste únicamente de hembras, siendo la reproducción partenogenética, es decir, el huevo se desarrolla sin haber sido fecundado. A 20°C les toma de 21 a 24 días para ser adultos, etapa donde alcanzan la madurez sexual. Ponen de entre 30 a 50 huevos que tardan de 7 a 10 días en salir del cascarón. Los huevos son blancos y esféricos, de 80 a 110µm de diámetro y la temperatura óptima incubación es de 21°C. A bajas temperaturas, la duración de cada etapa de desarrollo se extiende. Por ejemplo, el promedio de vida a 15°C es de 240 días, mientras que a 24°C es sólo de 111 días.

Esta especie de colémbolos se adapta bien a condiciones relativamente secas del suelo. Los hexápodos absorben vapor de agua y se mantienen activos por debajo de un 98.9% de humedad relativa. Además, la especie *F. candida* mejora su supervivencia en condiciones de sequía, si ha estado expuesta previamente a la desecación.

Un adulto puede experimentar 45 mudas en su vida con periodos cortos de reproducción, de una duración de 1.5 días aproximadamente, alternados con periodos no reproductivos de 8.5 días de duración. El revestimiento del intestino medio también se remueve y es desechado en las heces durante la muda. Este proceso proporciona una importante ruta de excreción de desechos y contaminantes acumulados en las células del intestino medio (Fountain and Hopkin 2005).

### ***Alimentación y digestión***

El tiempo que pasan los alimentos a través del intestino de *F. candida* a 20°C es de aproximadamente 35min. El proceso excretorio es más eficiente si el animal come regularmente, pero si los desechos y contaminantes son almacenados, estos son evacuados en el lumen cuando los colémbolos mudan y son perdidos en las excretas, de modo que la duración del proceso excretorio puede variar.

La mayoría de los colémbolos se alimentan de hifas fúngicas, y la *F. candida* no es una excepción, mostrando una fuerte preferencia por algunas especies de hongos. La *F. candida* consume e

inactiva hongos entomopatógenos aplicados como pesticidas biológicos sin provocar mortalidad, alteración de la reproducción o cualquier otro efecto nocivo (Fountain and Hopkin 2005).

El tracto digestivo de estas especies, es hábitat de una gran cantidad de microorganismos y su número varía durante el ciclo de muda. En particular, se ha identificado la especie de hongos *Acremonium*, la cual puede ayudar a *F. candida* en la digestión de los alimentos con contenido de celulosa (Giordano et al. 2010).

Aunque la *F. candida* retiene algunas especies de bacterias en su tracto digestivo, también excreta otras (Thimm et al. 1998). Por consiguiente, existe evidencia de que *F. candida* provee un estímulo importante de la descomposición. Por ejemplo, la presencia de *F. candida* en un microcosmos, duplicó la concentración de nitratos en los lixiviados de la descomposición de residuos vegetales pastizales en comparación con los controles sin colémbolos.

#### **4.5.3 Extracción de colémbolos de la tierra**

Existen diversos métodos para coleccionar colémbolos. Entre los más comunes, está el uso del embudo Berlese-Tullgren (Sandler, Falco, and Ciocco 2010). Fue desarrollado por Berlese en 1905 y posteriormente modificado por Krausse en 1915 y Tullgren en 1918. Este método requiere de la migración activa de los individuos. Los artrópodos se mueven en respuesta a cambios de un gradiente de humedad y temperatura. Este método es muy útil debido a que extrae organismos vivos y de buena movilidad.

#### ***Embudo de Berlese-Tullgren***

El método consiste en colocar un tamiz sobre un embudo. Sobre el tamiz se coloca una porción de suelo ligeramente desagregado manualmente. Sobre el embudo se aplica una fuente de luz durante 10 días. Para evitar un secado demasiado rápido, la muestra se humedece regularmente durante las primeras 72h. Conforme la muestra se va secando, los organismos se concentran en la parte inferior y acaban cayendo a un recipiente o colector oscuro, colocado en la parte inferior del embudo.

Puesto que la mayoría de los organismos del suelo son tanto lucífugos (huyen de la luz) como hidrófilos (con afinidad a la humedad), resulta fácil extraerlos aplicando un gradiente de luz y calor, incluso en menos días de los recomendados.

#### **4.5.4 Crecimiento en condiciones de laboratorio**

Las condiciones en las que se desarrollan los colémbolos en el suelo son muy distintas a las obtenidas en laboratorio. El medio natural donde se desarrollan está conformado por una gran

cantidad de elementos, a diferencia del laboratorio, donde la población se compone solo de unos individuos que viven en un ambiente ideal e ilimitado. No existen otros depredadores, de modo que no hay limitaciones en las capacidades de los individuos para obtener energía, crecer y reproducirse aparte de las restricciones biológicas intrínsecas de su especie (Campbell and Reece 2005).

En este caso el modelo es inicialmente exponencial  $y = ae^{rx}$ , donde se supone que la tasa de crecimiento poblacional se mantiene constante. Sin embargo, esto sucede en raras ocasiones y sólo por periodos reducidos (Valverde Valdés and Cano-Santana 2005). En algunas poblaciones se produce por ejemplo, inhibición en el crecimiento por la incidencia nociva de los propios desechos metabólicos (Ramírez González 1999). De modo que posteriormente la tasa de crecimiento se reduce y la curva de crecimiento describe una sigmoidea (forma de S) que tiende a un límite superior (Ramírez González 1999). En este caso se supone un modelo donde se considera que hay un tamaño poblacional máximo. Según el modelo, al proyectar el tamaño de la población obtenemos una curva logística. El modelo logístico constituye una modificación del modelo exponencial básico. La ecuación de un modelo general de crecimiento logístico es (Valverde Valdés and Cano-Santana 2005):

$$y = \frac{a}{1 + be^{-rx}}$$

## 4.6 Técnicas de caracterización

Con el fin de obtener información del material a través de los diferentes procesos, se emplean diversas técnicas de análisis de acuerdo a las características que se quieran obtener. En las siguientes secciones se explica de manera breve la aplicación y fundamentos de las técnicas usadas en este trabajo.

### 4.6.1 Microscopía Electrónica de Barrido

La microscopía electrónica de barrido, SEM por sus siglas en inglés (Scanning Electron Microscopy), es una técnica muy útil para la obtención de imágenes a nivel microscópico y nanoscópico con un alto grado de resolución. Al igual que un microscopio óptico utiliza luz para la obtención de imágenes, el SEM utiliza electrones para el mismo propósito.

El funcionamiento del SEM se basa en la interacción de un haz fino de electrones con la muestra, generando señales que brindan información acerca de la topografía, la composición química y otras propiedades como la conductividad eléctrica. Durante la interacción del haz de electrones

con la muestra se producen diferentes tipos de señales que incluyen electrones secundarios, electrones retro-dispersados, rayos X característicos y luz.

La Microscopía electrónica de barrido es una de las técnicas más versátiles para investigar la morfología de los materiales, permitiendo un rango amplio de magnificaciones. Una de las desventajas que presenta esta técnica es que la muestra que se va a analizar debe ser conductora (Levingstone 2008).

Un haz de electrones se enfoca pasando a través de una serie de lentes magnéticas. Posteriormente, un par de bobinas de barrido, ubicadas en el lente objetivo, desvían el haz ya sea linealmente o en forma de trama sobre un área rectangular de la superficie de la muestra (Dijk 1997; Levingstone 2008). El haz excita el material de la muestra haciendo que se den diferentes interacciones con los electrones o el núcleo de los átomos de la muestra. Las interacciones pueden resultar en la emisión de electrones o fotones desde o a través de la superficie. Una fracción de los electrones emitidos puede ser colectada por un detector. Las principales imágenes producidas por este tipo de instrumento son de tres tipos: imágenes de electrones secundarios, imágenes de electrones retrodispersados y mapeo elemental por los rayos X. Los electrones secundarios y retrodispersados son convencionalmente separados de acuerdo a sus energías.

Cuando la energía del electrón emitido es menor que 50eV, por convención se están refiriendo a los *electrones secundarios (SE)*. Electrones con alta energía son electrones primarios que han sido dispersados sin pérdida de energía cinética (elásticamente) por el núcleo de un átomo, aunque estas colisiones pueden ocurrir después de que los electrones primarios han perdido algo de su energía en la dispersión inelástica. Los *electrones retrodispersados (BSEs)* son considerados como los electrones que salen de la superficie con una energía mayor a 50eV, incluyendo los *electrones Auger*. Sin embargo la mayoría de *los electrones retrodispersados* tienen energías comparables a la energía del haz primario. Cuanto mayor es el número atómico de un material, más probable es que se produzca una retrodispersión. Por lo tanto como el haz pasa de un Z bajo (Z = número atómico) a un Z alto, la señal debida a la retrodispersión forma una imagen en la cual incrementa el brillo. La imagen que se construye en contrastes es causada por las diferencia en los números atómicos de los elementos presentes en la muestra.

Otra interacción electrónica adicional de gran importancia en el SEM, se produce cuando los electrones primarios chocan y expulsa un electrón del núcleo de un átomo en el sólido. El átomo excitado regresa a su estado fundamental por emisión de un fotón de rayos X característico. Esta señal se puede clasificar por la energía en un detector de rayos X de energía dispersiva o por la longitud de onda con un espectrómetro de longitud de onda (WDS) (Brundle, Evans, and Wilson 1992; Dijk 1997; Levingstone 2008). A continuación, se explica más a detalle el empleo de la energía dispersiva para analizar las muestras.

#### **4.6.2 Espectrómetro de rayos X por dispersión de Energía (EDS)**

Esta espectroscopia es usada para realizar análisis elemental semicuantitativo de una muestra. Se basa en el análisis de una muestra a través de las interacciones entre la radiación electromagnética y la materia, analizando los fotones de rayos X emitidos, en respuesta a la colisión de partículas cargadas. La generación de fotones de rayos X ocurre como resultado de procesos de dispersión inelásticas que pueden suceder entre los electrones y el material, y pueden ser de dos tipos; característicos, los cuales resultan cuando el haz de electrones expulsan electrones de las capas internas del átomo de la muestra, o continuos, los cuales resultan cuando el haz de electrones interactúa con el núcleo de los átomos de la muestra.

La capacidad de caracterización de esta técnica se deben en gran parte al principio fundamental de que cada elemento químico tiene una estructura atómica única que permite la identificación de los rayos X característicos (Brundle et al. 1992). La energía de los rayos X es característica del número atómico de la especie de la cual se deriva.

El haz de electrones del SEM, estimula la emisión de rayos X característicos presentes en una muestra. En reposo, un átomo dentro de la muestra contiene electrones en estado base (no-excitado) con niveles de energía discretos o capas de electrones ligadas al núcleo (*K*, *L*, y *M*). El haz incidente puede excitar un electrón en una capa interna, expulsándolo de la capa a la que pertenecía y creando un hueco. Un electrón de una capa externa de mayor energía puede ocupar el hueco, y la diferencia en energía entre las capas se libera en forma de rayos X. El número y la energía de los rayos X emitidos por la muestra pueden ser medidos por un detector conocido como espectrómetro de dispersión de energía.

Dado que la energía de los rayos X es característica de la diferencia de energía entre las dos capas, y de la estructura atómica del elemento de donde fueron expulsados, esto permite la medición de la composición elemental del espécimen en estudio. Se dice que las medidas elementales obtenidas por esta técnica son semicuantitativas ya que dependen de diferentes factores tanto de la muestra como del equipo. En el caso de la muestra, afecta el proceso de preparación, la geometría de la superficie de las muestras, junto con algunas características de la distribución de composición y la morfología. En cuanto al equipo afecta el sistema de detección, las ventanas usadas que pueden absorber los rayos X de baja energía (razón por la cual con EDS no se pueden detectar elementos con  $Z < 4$ ), aumentos en el voltaje generando corrimientos del pico, entre otros (Brandon and Kaplan 2008).

#### **4.6.3 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)**

La interacción de la radiación electromagnética con la materia permite obtener información acerca del comportamiento físico de los materiales. Para esto, la longitud de onda de la radiación incidente debe ser comparable o menor a las dimensiones del objeto de estudio.

La espectroscopia infrarroja estudia la interacción de la luz infrarroja (IR) con la materia. El espectro IR (absorción) es originado por los fotones en la región infrarroja que son absorbidos en

las transiciones entre los dos niveles de vibración de la molécula en el estado electrónico fundamental (Nakamoto 2009).



**Figura 13** Mecanismo de absorción del IR

En la Figura 13, se muestra  $I_0$  como la intensidad de la luz incidente a la muestra y como  $I$  la intensidad del haz después de interactuar con la muestra. A partir de estos valores, se determina la razón de intensidades ( $I/I_0$ ) como función de la frecuencia de la luz ( $\nu$ ). La gráfica de dicha razón vs la frecuencia da como resultado el espectro IR (Brundle et al. 1992). Existen diferentes modos de obtener la señal, el modo que se use depende en gran parte de la muestra. (Vickerman and Gilmore 2009).

La fracción de luz transmitida a través de la muestra, o transmitancia, se define como:

$$T_\nu = \left( \frac{I_t}{I_0} \right)_\nu$$

Donde  $T_\nu$  es la transmitancia de la muestra a una frecuencia  $\nu$  y  $I_t$  es la intensidad de la luz transmitida. Este modo de muestreo implica que el haz IR atraviesa la muestra, por lo tanto, la muestra debe ser por lo menos parcialmente transmisora de la región IR del espectro. Usando este modo, es posible ver como las mediciones de IR pueden estar relacionadas con la cantidad de material presente y su índice de refracción.

De manera similar, si lo que se mide es la luz reflejada de la superficie de la muestra, la razón para  $R_\nu$ , o la reflectancia de la muestra, al cambiar la  $I_t$  de la expresión anterior que corresponde a la Intensidad de la luz transmitida por la intensidad de la luz reflejada  $I_r$ . En el caso de la absorbancia, ésta está relacionada con la transmitancia a través de la ley de Beer-Lambert:

$$A = -\log T_\nu = (\epsilon_\nu)(bc)$$

Donde  $c$  es la concentración de los enlaces químicos responsables de la absorción de la radiación IR,  $b$  es el espesor de la muestra, y  $\epsilon_\nu$  es una constante de proporcionalidad dependiente de la frecuencia de absorción (Brundle et al. 1992). Muchas muestras son opacas a la radiación IR y por lo tanto no pueden ser estudiadas en el modo de transmisión.

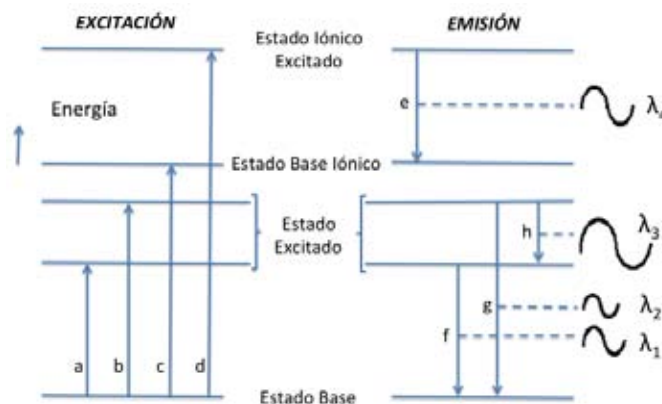
Cuando la radiación IR interactúa con la materia, ésta puede ser absorbida, causando que los enlaces químicos en la materia vibren. La presencia de enlaces químicos en un material es una condición necesaria para que ocurra la absorción infrarroja. Por esta razón es una de las pocas técnicas que proporcionan información acerca de los enlaces químicos en el material y es bastante usada debido a que es una técnica no destructiva para el análisis. Con ésta espectroscopia se puede establecer una correlación entre las posición de las bandas y la estructura química, ya que

los enlaces químicos propios de cada estructura, vibran a una frecuencia característica al absorber luz IR y estos datos son graficados en un espectro (Brundle et al. 1992).

La transformada de Fourier, ha complementado esta técnica para obtener la conocida espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés). La ventaja que representa es que toda la luz de la fuente cae sobre el detector en cualquier instante, lo que lleva a un incremento en la señal que mejora automáticamente la relación señal-ruido en el espectro obtenido. En este caso, para la identificación de la longitud de onda o la frecuencia se usa el análisis de frecuencias (análisis de Fourier) de la señal periódica en el detector producida por el interferómetro de Michelson o un dispositivo similar. Este dispositivo induce una variación periódica en la diferencia de longitud de la trayectoria entre los dos haces de la fuente (generalmente igual de intensos) producidos por un dispositivo óptico diseñado para dividir la intensidad del haz. Los dos haces, que contienen todas las longitudes de onda que emanan de la fuente, se recombinan y se detectan. La intensidad medida depende de los efectos globales en la diferencia de fases para cada longitud de onda componente. La diferencia de fase, por supuesto, varía con la longitud de onda de cada componente. La operación matemática de transformación de la señal, que varía con la longitud de la trayectoria a un espectro en el cual la intensidad varía con la longitud de onda, se conoce como la transformación de Fourier (Vickerman and Gilmore 2009).

#### **4.6.4 Espectroscopia de Emisión Óptica por Plasma acoplado Inductivamente (ICP-OES)**

El plasma de acoplamiento inductivo (ICP) es una fuente de ionización que junto a un espectrofotómetro de emisión óptica (OES) constituye el equipo de ICP-OES. En esta técnica, la muestra en forma líquida, es transportada por medio de una bomba peristáltica hasta el sistema nebulizador donde es transformada en aerosol gracias a la acción de gas argón. Dicho aerosol es conducido a la zona de ionización que consiste en un plasma generado al someter un flujo de gas argón a la acción de un campo magnético oscilante inducido por una corriente de alta frecuencia. En el interior del plasma se alcanzan altas temperaturas, del orden de 8000°C. En estas condiciones, los átomos presentes en la muestra son ionizados/excitados. Al volver a su estado, estos iones o átomos excitados emiten radiaciones de una longitud de onda característica de cada elemento (Figura 14). Esta radiación pasa a través de un sistema óptico que separa la radiación según su longitud de onda. A continuación un detector mide la intensidad de cada una de las radiaciones relacionando ésta con la concentración de cada elemento en la muestra. La información es procesada por el sistema informático (Brundle et al. 1992).



**Figura 14** Estados energéticos por los que pasan los electrones durante el análisis por ICP-OES

Con esta técnica es posible determinar de forma cuantitativa la mayoría de los elementos de la tabla periódica a nivel de trazas y ultratrazas. ICP-OES es usada para análisis en volumen de muestras líquidas o sólidos disueltos en líquidos, con el procedimiento adecuado; para hacer dichas medidas sobre superficies o películas delgadas, es necesario adaptarle técnicas como ablación láser o descargas de chispa (Brundle et al. 1992).

Las ventajas del ICP-OES son su velocidad (de medida), amplio rango dinámico lineal, bajos límites de detección, y relativamente pequeños efectos de interferencia. Por ejemplo, instrumentos automatizados con múltiples detectores pueden determinar simultáneamente 40 o más elementos en una muestra en menos de 1 minuto. La relación entre la intensidad de la emisión y la concentración es lineal en 5-6 órdenes de magnitud. Por lo tanto, elementos traza o minoritarios pueden ser medidos simultáneamente sin separación previa o preconcentración. El ICP-OES es una técnica destructiva que solo proporciona información de composición elemental (Brundle et al. 1992).

#### 4.6.5 Espectrofotómetro de absorción atómica

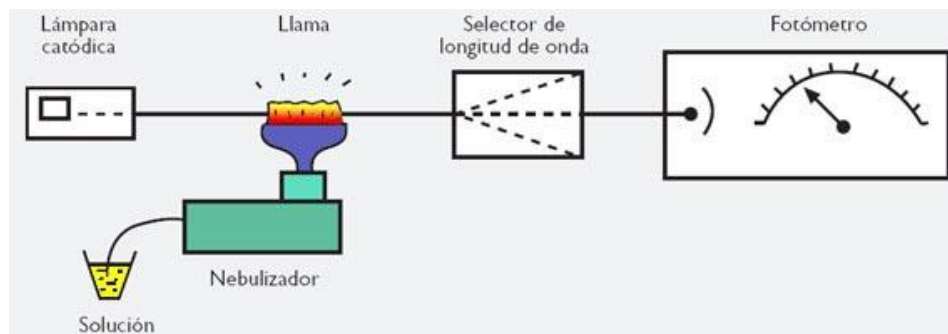
La espectrofotometría de absorción atómica se basa en la propiedad que tienen los átomos de absorber radiación electromagnética a una determinada longitud de onda. Cuando una radiación electromagnética incide sobre un átomo en estado fundamental, ésta puede ser absorbida y un electrón externo puede ser promovido a un estado excitado. Dado que ese estado es inestable, el átomo regresará inmediatamente al estado fundamental emitiendo una energía.

Para llevar a cabo este análisis, es necesario, atomizar la materia, es decir, convertir las moléculas de la muestra a analizar en partículas gaseosas elementales. Para ello, la muestra se calienta a temperaturas muy elevadas, que proporcionan, una vez eliminado el disolvente, la suficiente energía para disociar los enlaces químicos y liberar los átomos metálicos que absorben luz de una longitud de onda característica en cada caso. La banda de longitudes de onda a la que absorbe



cada elemento es estrecha y prácticamente única. La cantidad de radiación absorbida será proporcional al número de átomos del elemento presentes en el camino óptico, utilizándose por tanto, con fines analíticos cuantitativos mediante la aplicación de la ley de Lambert-Beer.

Un espectrofotómetro de absorción atómica consta de una serie de componentes como una fuente de radiación, un sistema de nebulización y atomización de la muestra, un monocromador y un detector.



**Figura 15** Principales componentes de un espectrofotómetro (Gallego Picó, Garcinuño Martínez, and Morcillo Ortega 2013)

La atomización de la muestra puede realizarse mediante vaporización electrotérmica, el uso de una llama, o un plasma. Un atomizador de llama consiste en un nebulizador neumático, que transforma la disolución de la muestra en una niebla, o aerosol, que se introduce en un quemador. El tipo más común de nebulizador es el de tubo concéntrico, en el que la muestra se aspira a través de un tubo capilar mediante un flujo de gas a alta presión alrededor de la punta del capilar (efecto Venturi). Las dos llamas más utilizadas son la de aire-acetileno, de color azulado, empleada para los metales de transición.

El detector mide la intensidad de la luz y amplifica la señal. Generalmente es un fotomultiplicador que produce una corriente eléctrica dependiente de la intensidad de la luz incidente. La corriente eléctrica del fotomultiplicador es procesada por un sistema amplificador.

En un sistema de haz sencillo, el monocromador se ajusta para seleccionar la línea atómica seleccionada para el análisis que se focaliza en el multiplicador. En un espectrofotómetro de doble haz, un cortador de haz divide la luz en pulsos que pasan alternativamente por la llama a través de un camino de referencia. Los haces de muestra y de referencia se recombinan posteriormente, midiéndose la relación de intensidades de ambos pulsos (Gallego Picó et al. 2013).

#### 4.6.6 Análisis de la fibra

A fin de cuantificar el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en la cascarilla de arroz, se pueden emplear métodos gravimétricos para determinar la digestibilidad de alimentos. Los métodos gravimétricos se basan en pesar el residuo que queda después de una solubilización enzimática o química de los componentes (Pak 1997).

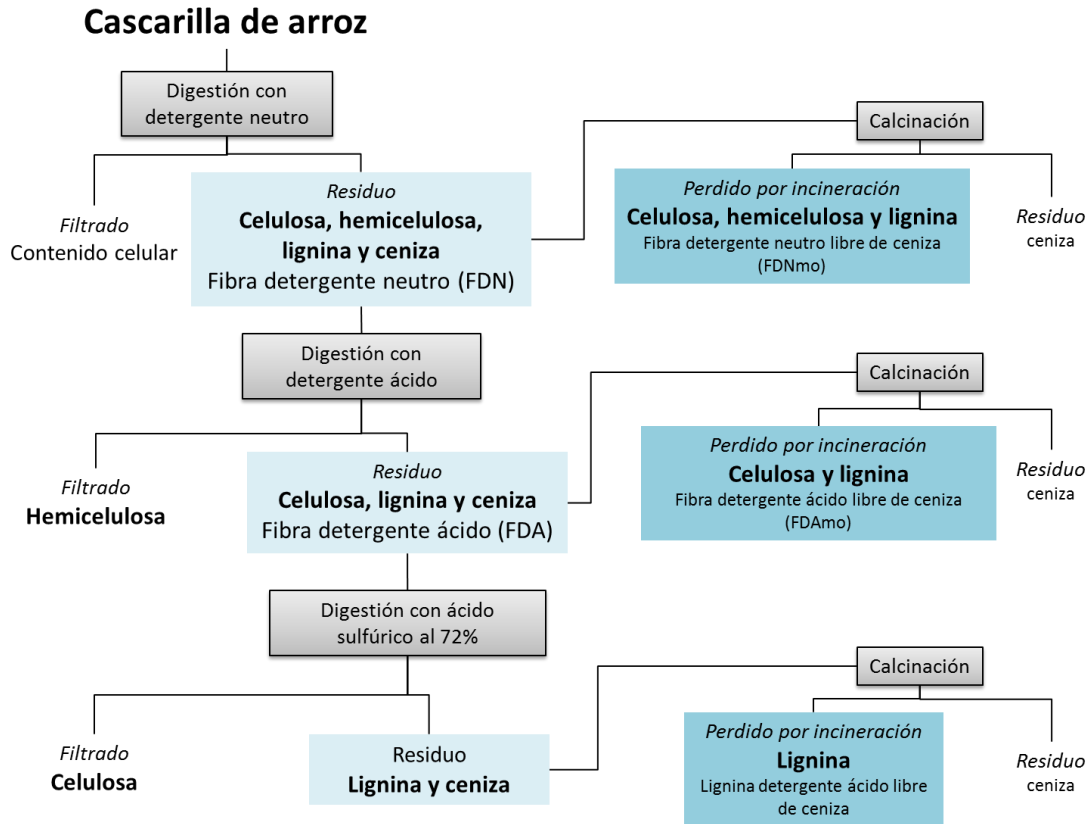
Uno de los sistemas de análisis de alimentos más importantes en investigación sobre nutrición de animales es el análisis de Fibra Detergente (Segura and Echeverri 2009). Debido a la necesidad de mejorar el sistema de análisis de alimentos, Peter Van Soest condujo al sistema detergente, reemplazando el sistema Weende o de análisis proximal. Se reemplazó el análisis de fibra cruda (FC) y extracto libre de nitrógeno por solubles en detergente neutro, fibra detergente ácida (FDA), fibra detergente neutra (FDN) y lignina para esclarecer aspectos nutricionales en términos de digestibilidad (Udén, Robinson, and Wiseman 2005). En alimentos ricos en hidratos de carbono se puede sobreestimar la fibra neutro detergente, por ello ha sido necesario modificar esta técnica con el agregado amilasa (enzima) que digiere los hidratos de carbono.

Los solubles en detergente neutro constituyen las fracciones completamente digeribles de carbohidratos y proteínas, así como lípidos y algunas cenizas. De modo que la FDN representa la fibra estructural, la cual es sólo parcialmente digerible, y la lignina que es la fracción de FDN completamente indigerible (Udén et al. 2005). El procedimiento de fibra detergente neutro, envuelve la extracción del material con una solución de laurilsulfato de sodio y la subsecuente determinación gravimétrica del residuo. Este método determina la fibra insoluble: celulosa, hemicelulosa y lignina (Pak 1997).

El método de fibra detergente ácido (FDA) consiste en someter la muestra a ebullición con bromuro de cetiltrimetilamonio en medio ácido y subsecuente filtración y lavado del residuo. Este método aísla principalmente celulosa y lignina, de modo que se puede cuantificar la hemicelulosa de la diferencia entre el método detergente neutro y ácido. Además, este método es usado para preparar un residuo bajo en proteína para el posterior análisis de lignina (Udén et al. 2005).

Finalmente la lignina detergente ácido, utiliza el método fibra detergente ácido como paso previo. El proceso consiste en tratar la FDA con una solución ácido sulfúrico al 72%, a fin de disolver la celulosa. Por tanto calculando la diferencia entre el método detergente ácido y lignina se estima la cantidad de celulosa.

Los tres procedimientos se realizan de manera secuencial. En la Figura 16 se muestra un diagrama mostrando los pasos generales.



**Figura 16** Secuencia general de pasos para determinar los componentes de la fibra

Se debe tener en cuenta que la sílice tiene cierta solubilidad en el detergente neutro, mientras que en el detergente ácido se recupera toda la sílice. Esto ha provocado que la gran variedad de métodos analíticos usados sean inconsistentes al reportar la información, lo que implica dificultades de comparación de resultados entre las diferentes publicaciones. Uno de los principales problemas en la literatura está en el reporte de ceniza, materia orgánica y sílice. No siempre se reporta si los valores de fibra han sido corregidos para ceniza y/o sílice. De manera que es necesario reportar o excluir los contenidos de ceniza de todos los datos (Van Soest 2006). En el lado derecho de la Figura 16 se muestra un proceso adicional de calcinado a fin cuantificar y eliminar de los resultados las cenizas presentes en la muestra.

## 5 Metodología

A continuación se detalla el proceso realizado, comenzando por la preparación de la cascarilla de arroz para remover las impurezas, y por otro lado obtener un alimento adecuado para el consumo de los colémbolos. Posteriormente, se lleva a cabo la extracción, cultivo y posterior uso de los colémbolos para el experimento. Finalmente, se procede con el cultivo de los colémbolos con diferentes sustratos y la extracción de las muestras para su posterior análisis.

## **5.1 Cascarilla de arroz**

La cascarilla de arroz proviene del estado de Veracruz, México. La cascarilla es molida hasta que pueda pasar una malla de 1mm. A continuación se lava con agua corriente repetidas veces hasta lograr eliminar toda la suciedad. Posteriormente se realizan tres enjuagues con agua destilada y se seca en el horno de 80°C durante 24 h.

## **5.2 Tratamiento con ácido cítrico**

La cascarilla molida y seca, es tratada con una solución de ácido cítrico al 0, 3, 5 y 7% (p/v) en una proporción de 1:25. La solución con el material, se mantiene en constante agitación y en baño controlado a 50°C durante 15 minutos. Posteriormente la cascarilla de arroz se filtra y se enjuaga hasta que el agua de filtrado sea neutra. La cascarilla tratada se seca en el horno de 80°C durante 24 h.

Las diferentes concentraciones empleadas se realizan con el fin de conocer los efectos de diferentes concentraciones de ácido cítrico en la cantidad de impurezas removidas en el material.

## **5.3 Tratamiento peróxido alcalino**

De entre los diferentes tratamientos peróxido alcalino aplicados a fibras, destaca el proceso realizado a bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno (1% p/v) en un medio alcalino (pH 11.5) y a temperatura ambiente. En estas condiciones, se puede perder entre un 50-60% de la lignina del material en 24 horas (Gould y Freer, 1984). Si se aumenta la temperatura de reacción se favorece la degradación de la lignina (Sun et al. 2000a), sin embargo la descomposición del peróxido es mucho más rápida.

Además de la temperatura, el peróxido de hidrógeno se degrada fácilmente bajo ciertas condiciones. Su descomposición aumenta significativamente con la presencia de iones metálicos (Gould, 1985). Por este motivo, al realizar el tratamiento con ácido cítrico antes del tratamiento con peróxido se evita en gran medida su degradación.

La duración del material en la solución peróxido alcalina, reportado en la literatura, es en general de 24 horas (Saha y Cotta, 2007; Gould, 1985, Gould et al., 1989; Sun et al. 2000a). Sin embargo, después de las primeras 2 horas de reacción, el pH comienza a incrementarse gradualmente hasta

alcanzar un valor cercano a pH 13 a las 24 horas de reacción (Sun et al. 2000a). Estas condiciones de pH se encuentran muy por fuera de las condiciones iniciales.

Sin embargo, aunque el pH 11.5 es el óptimo para degradación de la lignina con peróxido, en un pH mayor a 12.5 también se ve favorecida la delignificación (Gould, 1985). No obstante, conforme el pH se vuelve más alcalino se comienza a disolver una mayor cantidad de hemicelulosa en la solución (Sun et al. 2000a). Además, el medio altamente alcalino propicia la generación de silicatos, por lo tanto se pierde gran cantidad de sílice en el proceso (Sun et al. 2001), por lo que estas condiciones no resultan adecuadas para los objetivos perseguidos en este proyecto.

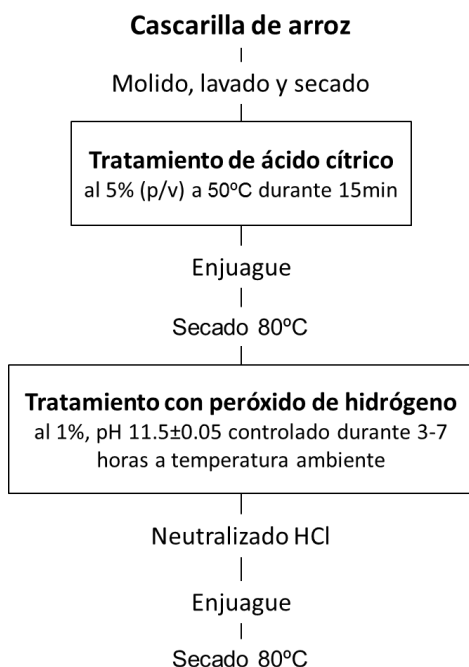
En la mayoría de las investigaciones reportadas en la literatura, el pH 11.5 no se mantiene durante la reacción, esto se debe a que los propósitos van encaminados hacia la obtención de celulosa.

Si se emplea un pH 11.5 controlado durante toda la reacción, la generación del anión hidropéroxido se verá favorecida durante todo el tiempo de reacción. Además, al mantener un pH controlado, se podría evitar la pérdida de la sílice y hemicelulosa, dado que su solubilización se incrementa con el aumento de pH.

Por otro lado, al mantener la concentración de los aniones a niveles óptimos durante todo el tiempo de reacción, los tiempos de reacción podrían reducirse. Además, dado que en las primeras 4 horas de la reacción se disuelve la mayor parte de la lignina en materiales similares a la cascarilla de arroz (Sun et al. 2000a), se pueden considerar tiempos de reacción menores a los usados para la delignificación con peróxido alcalino. Cabe señalar que no existen investigaciones donde hayan sido empleados estas condiciones de delignificación para la cascarilla de arroz.

Utilizando cascarilla de arroz tratada previamente con una solución de ácido cítrico al 5% (p/v) y de acuerdo a lo anterior, el método empleado consiste en someter al material a una solución de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 1% en una proporción de solución a cascarilla de 50:1 (ml/g) con el pH ajustado a 11.5 mediante la adición de la solución NaOH 4 M. El pH se mantiene a 11.49-11.51±0.05 por la adición periódica de  $H_2O_2$  según sea necesario. La reacción se mantiene en agitación durante 3-7 horas a temperatura ambiente. Las muestras se neutralizan con *HCl* concentrado y se enjuagan con agua destilada varias veces. Finalmente se secan en un horno a 80° C durante 24 h.

El proceso se resume en el diagrama de la Figura 17:



**Figura 17** Proceso general empleado en la cascarilla de arroz

## 5.4 Cultivos de Colémbolos

### 5.4.1 Reproducción de colémbolos en condiciones de laboratorio

Con el objetivo de preservar y reproducir los colémbolos extraídos de la tierra, los artrópodos deben ser mantenidos en condiciones óptimas para asegurar su desarrollo y reproducción. De manera general, los colémbolos deben encontrarse en condiciones humedad elevada, temperatura moderada (menor a 24°C), alimento disponible y en oscuridad constante.

Existen diferentes tipos de sustratos que pueden emplearse, como tierra, fibra de coco, yeso con carbón activado, etc. En particular, el sustrato compuesto de yeso con carbón activado permite tener una superficie lisa, que además de mantener una alta humedad por su porosidad, facilita el control del alimento y número de colémbolos y permite la detección oportuna de la presencia de alguna plaga.

#### ***Sustratos de yeso y carbón***

Para preparar el sustrato para cultivo se mezclan en seco, proporciones de 5:1 ó 3:1 de yeso (*marca San Patricio*®) y carbón activado (*marca Sigma*®). La mezcla se agrega a un recipiente con agua destilada, se mezcla ligeramente y se deja reposar por cinco minutos. Posteriormente se

mezcla nuevamente hasta obtener una pasta homogénea y se vierte rápidamente en vasos desechables de 250ml, de manera que se obtengan unos 2cm de grosor. La mezcla se deja secar por cinco días, y posteriormente se humedece con agua destilada para ser usada en los cultivos.



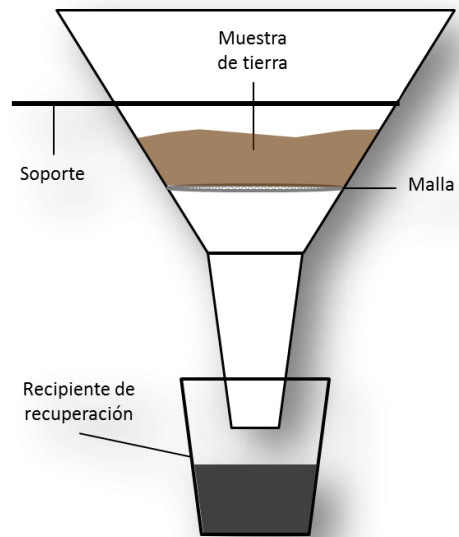
**Figura 18 Frasco de cultivo con un sustrato de yeso con carbón activado**

### ***Extracción de colémbolos***

Para extraer los colémbolos de la tierra, se utiliza el método del Embudo de Berlese-Tullgren. El método consiste en colocar una muestra de tierra de maceta en el embudo, sobre la malla. Tanto el embudo como la malla son de metal, con el fin de evitar que los artrópodos queden adheridos por estática. La tierra se deja secar a temperatura ambiente con luz natural. A la salida del embudo se coloca un sustrato húmedo de yeso con carbón activado, realizado de acuerdo a la sección previa.

Debido a la alta temperatura y baja humedad en la región de Querétaro, la tierra se seca en tres días aproximadamente sin necesidad de una fuente de luz adicional.

En la Figura 19 se muestra el montaje utilizado para la extracción de colémbolos.



**Figura 19 Embudo de Berlese-Tullgren usado para la extracción de los colémbolos de la tierra**

### ***Alimento y condiciones de humedad***

Una vez extraídos los colémbolos, se distribuyen en los sustratos. En el caso de la especie utilizada en este experimento (*F. candida*), no es necesario determinar el sexo de los colémbolos para distribuirlos en los sustratos, debido a sus características de reproducción. Para otras especies como la *Onychiurus folsomi* por ejemplo, es preferible colocar en cada frasco igual número de machos o hembras. Posteriormente los cultivos se colocan dentro de un contenedor de cartón para mantener los cultivos en oscuridad constante, alejados de insectos, pero que permita la ventilación.

Aunque la porosidad de los sustratos ayuda a mantener la humedad de los cultivos, debe agregarse agua destilada con un gotero diariamente a fin de mantener una humedad alta en los cultivos. La baja humedad por periodos prolongados, puede provocar la muerte de los colémbolos.

Para la alimentación, se añade levadura para pan comercial (*Tradi-Pan*<sup>®</sup>) de acuerdo al número de colémbolos del cultivo. La levadura puede humedecerse previamente y añadir algunas gotas al sustrato. Sin embargo, también se pueden añadir directamente en polvo, sobre todo si el sustrato se mantiene con una humedad elevada. Es recomendable que la levadura no permanezca en el cultivo demasiados días, debido a que pueden proliferar hongos blancos en el alimento. Si esto sucede, significa que se está añadiendo demasiado alimento. Se debe retirar inmediatamente toda la levadura del sustrato con una espátula y añadir nuevamente una menor cantidad.





**Figura 20** Cultivo de colémbolos visto desde arriba. En el centro se observa la levadura y distribuidos en la superficie la especie *Orthonychiurus folsomi*

### ***Crecimiento***

A fin de poder obtener comparación entre los diferentes experimentos llevados a cabo, es necesario caracterizar el crecimiento de la especie bajo las condiciones más cercanas a lo ideal obtenidas a nivel laboratorio.

Para determinar el crecimiento se inician 5 cultivos en sustratos nuevos de yeso con carbón activado. Se coloca un pequeño grupo de colémbolos (8-10 aproximadamente) y levadura como alimento. Las condiciones de humedad se mantienen alrededor del 98% de humedad relativa.

A fin de contabilizar los colémbolos, se toma una fotografía al sustrato y posteriormente se procesa la imagen para determinar el número de colémbolos. Este proceso se repite cada 5 días aproximadamente durante un periodo de 30 días.

### **5.4.2 Traslado y conteo de colémbolos**

Para el traslado de colémbolos pueden emplearse diferentes técnicas, como el uso del *pincel*. Este instrumento es básicamente una aguja fija en un mango de madera. La aguja se humedece para que los colémbolos se adhieran y puedan ser extraídos de los cultivos sin sufrir daños. Sin embargo, este tipo de técnicas solo son útiles cuando se trata del traslado de unos cuantos colémbolos o para colémbolos de especies como la *Onychiurus folsomi*, los cuales tienen

movimientos lentos y no tienen la fúrcula desarrollada (no pueden brincar). Sin embargo colémbolos de especies como *Folsomia candida*, que son más pequeños, brincan y se mueven mucho más rápido, son más difíciles de manipular.



**Figura 21 Traslado de un colémbolo con la técnica del pincel**

Con el propósito de mover una gran cantidad de colémbolos, se puede volcar con cuidado el frasco de cultivo sobre una hoja de papel aluminio. Este material permite que se puedan trasladar con facilidad, ya que evita que se adhieran por estática.

Por otro lado, para contabilizar colémbolos se puede tomar una fotografía y posteriormente procesar la imagen y determinar el número de colémbolos. Cuando los colémbolos se encuentran un sustrato de yeso y carbón, la fotografía es fácil de procesar, debido al contraste y la superficie lisa del material. Sin embargo, cuando el material del sustrato permite el paso de los colémbolos, es conveniente verter previamente agua destilada con el fin de que todos los colémbolos floten en la superficie.

Para determinar el número de colémbolos transferidos a un nuevo sustrato, se toma una fotografía de la hoja de aluminio con los colémbolos y se procesa. En este caso el procesamiento se puede dificultar debido a la falta de contraste, por lo que se debe asegurar que la superficie del aluminio se encuentre lo más lisa posible.



**Figura 22** Ejemplo de fotografía para contabilizar colémbolos (*Folsomia candida*)

### **5.4.3 Identificación de la especie**

Para llevar a cabo la clasificación de la especie se emplean métodos basados en las hipótesis de las relaciones entre organismos, las cuales representan el árbol filogenético de la vida.

Los colémbolos se montan en solución Hoyer, y con un microscopio de contraste de fases, se determinan diversas características como el número de ojos, la longitud de la furca, etc., a fin de establecer la especie (Uribe-Hernández, Raúl, Juárez-Méndez, Carlos H., Montes de Oca, Marco A., Palacios-Vargas, José G., Cutz-Pool, Leopoldo, & Mejía-Recarmier 2010). Estos datos también pueden ser ingresados en softwares especializados los cuales calculan todas las posibles relaciones entre las especies.

### **5.4.4 Sustratos de cascarilla de arroz**

Los cultivos de *Folsomia candida* pueden adaptarse al cambio de alimento, sin embargo, en ese proceso pueden comenzar a buscar otro tipo de alimentos en el medio, como el sustrato de yeso con carbón, los huevecillos, las mudas, etc. (Figura 23).



**Figura 23** Colémbolo con el tracto digestivo oscuro debido al consumo del sustrato (*Orthonychiurus folsomi*).

De acuerdo a pruebas anteriores, para evitar cualquier interacción con otros materiales en los cultivos, es necesario reducir el medio al alimento, agua y colémbolos. Considerando estas condiciones, además de la necesidad de tener un sustrato que permita tener húmeda la superficie y permita la movilidad de los colémbolos, se utiliza el mismo alimento como sustrato.

Para disminuir las proporciones, los cultivos se realizan en tubos de policarbonato de capacidad de 10ml. En la Tabla 2 se muestra la distribución de variables que conforman cada grupo de cultivos.

Se emplea cascarilla tratada con una solución 5% de ácido cítrico, y posteriormente con una solución peróxido alcalina durante 7 horas con un pH controlado de 11.5. Para fines prácticos se le citara como “cascarilla tratada”, refiriéndose al tratamiento peróxido alcalino.

De la misma manera, se emplea cascarilla tratada con una solución 5% de ácido cítrico únicamente, es decir no fue tratada con la solución peróxido alcalina. Para fines prácticos se le citara como “cascarilla no tratada”, refiriéndose al tratamiento peróxido alcalino.

Clave	Tipo de cascarilla	Colémbolos	No de tubos
<b>Bco</b>	Sin cascarilla	No	2
<b>CT</b>	Cascarilla tratada	No	2
<b>CNT</b>	Cascarilla no tratada	No	2
<b>CT+CB</b>	Cascarilla tratada	Si	4
<b>CNT+CB</b>	Cascarilla no tratada	Si	6
<b>CB</b>	Sin cascarilla	Si	3

**Tabla 2** Distribución de las variables en los cultivos

La distribución de los cultivos se realiza con el fin de obtener la información necesaria con el menor número de cultivos. Para el caso de los cultivos blanco o de referencia, se colocan por

duplicado (Bco, CT, CNT). Estos tienen la finalidad de servir de comparación para corroborar que los resultados obtenidos en los cultivos CT+CB y CNT+CB sean debido a la presencia de colémbolos.

De manera similar se preparan tres cultivos de colémbolos sin sustrato, con el fin de corroborar que los resultados obtenidos en los cultivos CT+CB y CNT+CB sean debido a la interacción de la cascarilla con los colémbolos y no solo debido a la presencia de colémbolos.

Finalmente, se disponen dos duplicados de cultivos con colémbolos para la cascarilla no tratada, y finalmente tres duplicados para la cascarilla tratada. Esto debido a que corresponden a los cultivos donde se desea tener la mayor cantidad de información.

De acuerdo a la Tabla 2 se añaden 0.2g de cascarilla de arroz tratada o sin tratar según corresponda. El volumen del material es una cantidad considerable de material para tener un medio húmedo adecuado para los colémbolos. Posteriormente se agregan 2ml de agua destilada a cada tubo, se agita por unos minutos a fin de que todo el material se humedezca y se extrae el agua sobrante. A continuación se añade nuevamente 1ml de agua destilada. El proceso general se ilustra en la Figura 24.



**Figura 24** Preparación de cultivos con cascarilla

Como se explicó anteriormente, los colémbolos se transfieren de los cultivos en base de yeso con carbón a los tubos por medio de una hoja de aluminio, aproximadamente 180 colémbolos por cultivo (Figura 25). Los colémbolos se contabilizan y posteriormente se añaden a los tubos según la distribución de la Tabla 2.



**Figura 25.** Traslado de colémbolos a los tubos de cultivo con cascarilla

Los tubos que únicamente tienen colémbolos (sin cascarilla), contienen 2ml de agua, con ello se asegura que permanezcan húmedos sin sustrato durante todo el experimento.

Con el fin de mantener la humedad adecuada, los tubos se colocan en un microambiente, el cual consta un sistema que provee humedad al cultivo, un higrómetro con termómetro y una cámara. Todo el conjunto se mantiene sellado para evitar la contaminación por insectos. El sistema se mantiene oscuridad dentro de un contenedor de cartón para amortiguar los cambios de temperatura.

Las condiciones de cultivo se monitorean registrando la temperatura y humedad cada 3 horas. Con la cámara se toman las fotografías automáticamente. La pantalla del dispositivo se encuentra fuera del microambiente, y es iluminada por medio de un led. En la Figura 26 se muestra un ejemplo de las fotografías del monitoreo.



**Figura 26.** Fotografía de monitoreo de humedad y temperatura

El microambiente se mantiene en las condiciones mencionadas por 30 días.

#### **5.4.5 Obtención de muestras de los cultivos**

Para la extracción de las muestras al finalizar el periodo, se añaden 2ml de agua destilada a cada tubo. Los tubos se agitan por unos minutos y se extrae el líquido con una jeringa para insulina de 1ml. El proceso se repite dos veces para cada tubo de cultivo. La muestra líquida extraída se coloca en un tubo con tapa y se congela hasta su análisis. En la Figura 27 se muestran muestras líquidas extraídas de los tubos de cultivo.



**Figura 27.** Muestras líquidas extraídas de los cultivos

El líquido de los tubos se evapora en el horno a 80°C durante 24h. Posteriormente se determina el peso del residuo seco de cada tubo.

A fin de eliminar cualquier material orgánico en los residuos, estos se calcinan a 600°C durante tres horas y se determina el peso.

## **6 Caracterización**

### **6.1 Análisis de composicional**

#### **Análisis de impurezas**

Para determinar el contenido de impurezas, las muestras tratadas con ácido cítrico fueron analizadas para Mn, Fe, Al, Zn, P y S con un Espectroscopio de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES iCAP 6000, Thermo) y para Na, Ca, Mg y K fueron analizadas Espectroscopio de absorción atómica con flama (FAAS Perkin Elmer AAnalyst 300).

Las muestras de cascarilla tratada fueron calcinadas a 600°C durante 3 horas. A continuación se pesan las muestras calcinadas (0.25g) y se colocan en los vasos para microondas. A cada vaso se le

agregan 10ml de ácido nítrico al 70%. Como referencia, se coloca un vaso adicional al cual se le agregan las mismas impurezas a determinar en concentraciones conocidas.

Posteriormente los vasos se someten al tratamiento "Sedimentos" programado en el microondas Marsx press CEM, mostrado en la Figura 28.



**Figura 28** Microondas para la digestión de las muestras en ácido

Una vez terminado el ciclo, se dejaron enfriar y se transvasaron a botes de teflón para su evaporación, enjuagando con agua desionizada tres veces. Para evaporar el ácido, los vasos se colocaron en parillas a 100°C. Una vez que se hubo evaporado todo el líquido, se retiraron de la parrilla y se dejaron enfriar. Posteriormente se les agregó agua ácida (2% de ácido nítrico), hasta que la muestra se disolviera nuevamente. A continuación, las muestras fueron filtradas por una membrana de 0.45 $\mu$ m, enjuagando varias veces. Todas las muestras fueron aforadas a agregando agua ácida (al 2%) hasta completar 25ml. Finalmente las muestras fueron examinadas en los equipos.

a)



b)



**Figura 29** Equipos para cuantificación de impurezas, a) ICP-OES iCAP 6000, Thermo, b) FAAS Perkin Elmer AAnalyst 300



## Análisis de fibra

Posterior al tratamiento con peróxido alcalino, se realiza un análisis de fibra para determinar las proporciones de los principales componentes: celulosa, hemicelulosa y lignina. El procedimiento consiste en un análisis secuencial que comienza con la determinación de la fibra detergente neutro (FDN).

La FDN de la muestra fue determinado por el método de Van Soest, utilizando la técnica de la bolsa de papel filtro (Ankom 1997b; Van Soest and Robertson 1991). Para realizar el tratamiento se utilizó el Extractor Ankom A200 y bolsas de papel filtro (ankom F57), compuestas de poliéster y poliestireno.

Considerando los grupos adicionales de muestras que se calcinaran en cada etapa, se registra el peso de las bolsas correspondientes más una adicional para la corrección del blanco. La determinación se realiza por triplicado. Las bolsas se pesan con la muestra seca, se sellan y se etiquetan. Las bolsas con las muestras se distribuyen en los soportes y posteriormente se colocan en el extractor. Se vierte la solución detergente neutra, preparada según Van Soest (1991), y se comienza el ciclo, donde se eleva la temperatura a 100°C. Una vez finalizado, se realizan varios enjuagues utilizando el ciclo del extractor para elevar la temperatura del agua.

Las muestras se retiran de los soportes y se secan en el horno a 100°C durante toda la noche. Posteriormente se pesan, y se continúa con el siguiente proceso. Una muestra de cada tipo es calcinada para determinar la cantidad de cenizas en esta etapa.

En la Figura 30 se muestran los principales elementos y materiales que componen el extractor.



a)

b)

c)

**Figura 30** Componentes y materiales del analizador Ankom 200, a) bolsas de papel filtro, b) soportes de muestras, c) extractor

Para obtener la fibra detergente ácida, se empleó la modificación de la bolsa de papel filtro (Ankom 1997a; AOAC 2000).

Después del procedimiento anterior, las bolsas se colocan nuevamente en el soporte y posteriormente en el extractor. Se vierte la solución detergente ácida y se comienza el ciclo. Al finalizar se realizan los enjuagues recomendados y se retiran las muestras. Nuevamente se colocan en el horno a 100°C durante toda la noche. Posteriormente se registra el peso. Una muestra de cada tipo es calcinada para determinar la cantidad de cenizas en esta etapa.

Finalmente, se determina la cantidad de lignina ácida de las muestras (Georing and Van Soest 1970). Posterior al análisis de FDA, las muestras se colocan en una solución al 72% de ácido sulfúrico, según el procedimiento. Una vez realizado, las bolsas se colocan en el extractor para realizar los enjuagues. Posteriormente se secan en un horno a 100°C durante toda la noche. Posteriormente se registra el peso. Una muestra de cada tipo es calcinada para determinar la cantidad de cenizas en esta etapa.

### **Determinación de cenizas**

Para determinar la cantidad cenizas en las muestras tratadas con la solución peróxido alcalino y el residuo seco del tratamiento con los cultivos, se utilizó la mufla felisa FE 361 (Figura 31).

Las muestras se secaron previamente en un horno a 80°C durante 24h para determinar el peso seco. Posteriormente las muestras se colocan en la mufla, la cual se programa con incrementos de 1°C/min hasta llegar a 600°C la cual se mantiene durante 3 horas.



**Figura 31** Mufla Felisa

Una vez finalizado el ciclo, se espera hasta que la temperatura de la mufla se reduzca a 100°C. Las muestras se transfieren a un desecador, donde se mantienen hasta alcanzar temperatura ambiente. Finalmente se registra el peso con una balanza analítica.

## 6.2 Análisis estructural

### Análisis infrarrojo

Las muestras de cascarilla tratadas con la solución de ácido cítrico al 5% (*p/v*) y posteriormente con una solución peróxido alcalino en diferentes condiciones, fueron analizadas con un espectrofotómetro de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) Bruker Vector 33 utilizando la técnica de pastillas de KBr (bromuro de potasio). Los espectros se obtuvieron realizando 32 barridos, en un rango de  $4000$  a  $400\text{cm}^{-1}$  con una resolución de  $4\text{cm}^{-1}$ .

Las muestras de cascarilla se muelen hasta pasar una malla de  $0.1\text{mm}$ . Posteriormente se mezclan  $2\text{mg}$  de muestra y  $100\text{mg}$  de KBr, previamente seco y molido. El polvo es prensando para formar la pastilla.



Figura 32 Espectrofotómetro Infrarrojo

## 6.3 Análisis de morfológico

### Análisis microscópico

Para analizar la cascarilla y las cenizas obtenidas de la muestras extraídas de los cultivos con cascarilla de arroz, se utilizó un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) marca *JEOL modelo JSM-6060LV*.

Los portamuestras son pulidos con pasta para metal hasta obtener brillo de espejo. Posteriormente se colocan en un baño ultrasónico dentro de una solución concentrada de acetona. Finalizado el ciclo, se retiran de la solución y se dejan secar. Los portamuestras se etiquetan y se les coloca una cinta de carbón. Finalmente, se coloca la muestra calcinada correspondiente.

Las muestras no son conductoras, de modo que para obtener las imágenes, se debe realizar un recubrimiento de oro. Se utilizó el Electron Microscopy Sciences 550 Sputter Coater, realizando dos ciclos de 4min.

De manera paralela, se utilizó el espectrómetro de rayos X por dispersión de Energía (EDS) integrado en el microscopio. Esto con el fin de determinar cualitativamente la composición de la muestra observada.



**Figura 33** Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) JEOL

## **7 Resultados y discusión**

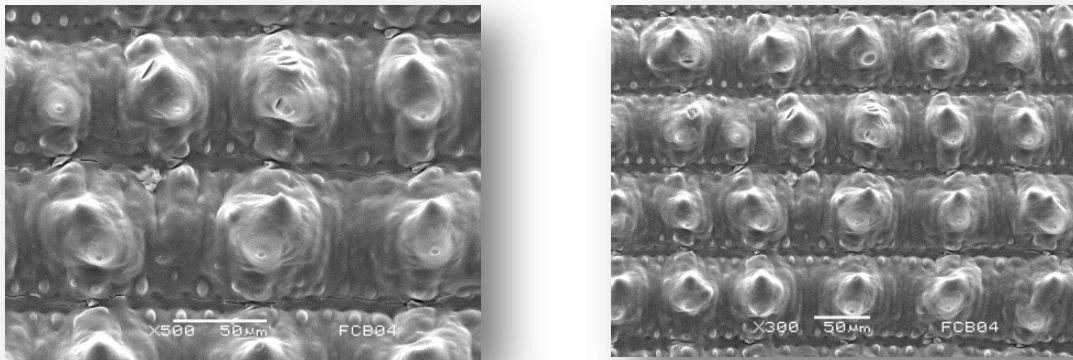
### **7.1 Cascarilla de arroz**

La parte externa de la cascarilla de arroz está formada por una gran cantidad de protuberancias ordenadas en toda la superficie que se pueden apreciar a simple vista, así como algunos macropelos como se observa en la Figura 34.



**Figura 34** Parte externa de la cascarilla de arroz sin tratar

Al analizar la cascarilla por medio del Microscopio Electrónico de Barrido, se pueden observar las protuberancias como cúmulos de sílice, como se aprecia en las dos micrografías de la Figura 35. La sílice se localiza mayormente en las células epidérmicas que se encuentran en la superficie, aunque también se encuentra en otras partes del material (Sun et al. 2001). La mayor parte del óxido de silicio no se encuentra enlazado a la cascarilla, menos del 3% está químicamente ligado a los polímeros (Patel et al. 1987).



**Figura 35** Micrografías de la parte externa de la cascarilla de arroz sin tratar

## 7.2 Remoción de impurezas metálicas en la ceniza de cascarilla de arroz

Como se ha mencionado anteriormente, la cascarilla de arroz sin ningún tipo de tratamiento de lixiviación, contiene una gran cantidad de óxidos metálicos en las cenizas. Al emplear una solución de un ácido carboxílico en vez de las soluciones convencionales con ácidos fuertes, es posible reducir la concentración de las impurezas, generando sílice de mayor pureza.

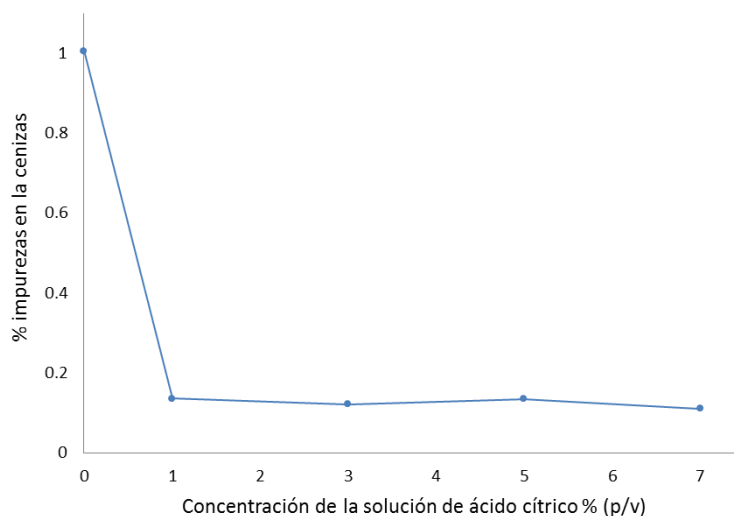
En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos al analizar cenizas de cascarilla de arroz tratada (3, 5 y 7 h) y sin tratar (0 h), usando ICP-OES, para determinar la cantidad de Mn, Fe, Al, Zn, P y S y un espectrofotómetro de absorción atómica para el Na, Ca, Mg y K presentes en las muestras.

cítrico (% p/v)	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ppm	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ppm	MnO ppm	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ppm	S ppm	Zn ppm	CaO ppm	K <sub>2</sub> O ppm	MgO ppm	Na <sub>2</sub> O ppm	Total de impurezas %
0	52.1 ± 0.0	301.6 ± 0.0	814.5 ± 0.0	338.4 ± 0.0	290.1 ± 0.0	74.1 ± 0.0	2756.8 ± 0.0	1390.2 ± 0.0	963.2 ± 0.0	3078.7 ± 0.0	1.006
1	40.8 ± 0.7	165.3 ± 2.8	99.1 ± 1.4	272.5 ± 7.0	97.7 ± 3.6	17.4 ± 1.6	232.5 ± 47.5	90.0 ± 26.1	115.2 ± 1.5	230.4 ± 18.8	0.136
3	41.0 ± 2.6	158.4 ± 4.4	68.8 ± 3.3	265.0 ± 13.8	143.8 ± 20.0	12.8 ± 0.6	200.7 ± 6.9	28.2 ± 28.2	95.5 ± 0.2	191.0 ± 397.5	0.121
5	39.1 ± 0.1	180.9 ± 76.8	72.4 ± 0.3	269.2 ± 3.8	143.8 ± 23.1	13.2 ± 0.4	274.7 ± 70.5	24.5 ± 24.5	105.0 ± 7.0	228.9 ± 18.2	0.135
7	37.1 ± 2.3	161.5 ± 35.8	57.4 ± 7.2	273.5 ± 23.9	98.5 ± 2.2	16.3 ± 1.9	191.8 ± 24.0	<l.c.	92.6 ± 5.4	176.2 ± 0.5	0.110

**Tabla 3** Comparación de las impurezas presentes en la ceniza de cascarilla con y sin tratamiento

Si bien, los tratamientos con ácidos fuertes son más eficientes que con ácidos orgánicos (Chandrasekhar et al. 2005), el tratamiento con ácido cítrico reduce considerablemente la cantidad de impurezas metálicas en la cascarilla de arroz.

En la Tabla 3, se observa que hay un reducción importante en la mayoría de las impurezas, aunque para el caso del *P*, *Fe* y el *Al* la reducción es baja, en ese orden. Sin embargo, la concentración de estas impurezas en la cascarilla de arroz sin tratar es relativamente baja.



**Figura 36** Reducción de las impurezas totales en la ceniza de la cascarilla de arroz

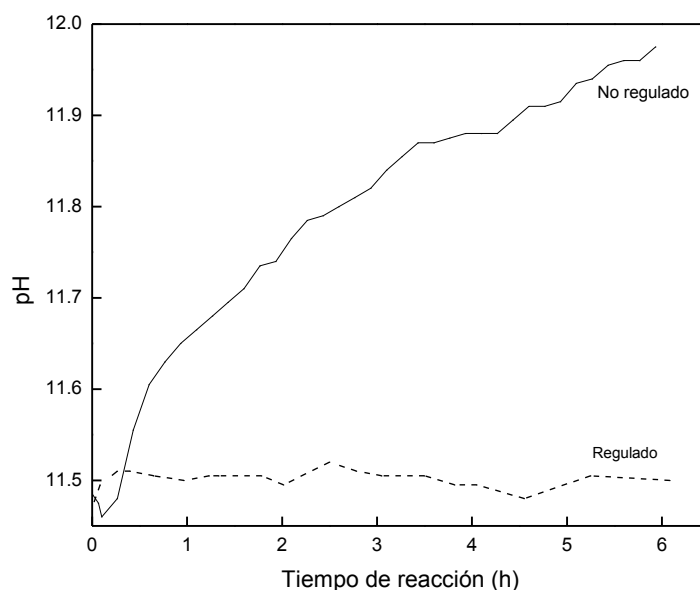
En la Figura 36 se puede observar la reducción de las impurezas totales respecto a la concentración de ácido cítrico en la solución. Inclusive a una concentración de 1% (p/v) se obtiene una reducción importante de las impurezas.

De este modo, la concentración de ácido cítrico de 5% (p/v) usada para tratar la cascarilla de arroz previo al tratamiento peróxido alcalino es adecuada para la reducción de las impurezas.

### 7.3 Tratamiento peróxido alcalino

El peróxido de hidrógeno se degrada rápidamente en una solución alcalina, debido a que los productos de su disociación vuelven a reaccionar con el peróxido de hidrógeno no disociado, desencadenándose una gran cantidad de reacciones que terminan por degradar el peróxido (Gould 1985b).

Si el pH no se controla, la reacción puede alcanzar un pH de 12.3 o más después de 7 horas, debido a la descomposición del peróxido de hidrógeno. En la Figura 37 se muestran los cambios de pH durante la reacción cuando el pH no está regulado en comparación con el tratamiento regulado. La reacción regulada se mantuvo dentro del intervalo  $11.49-11.51 \pm 0.05$ .

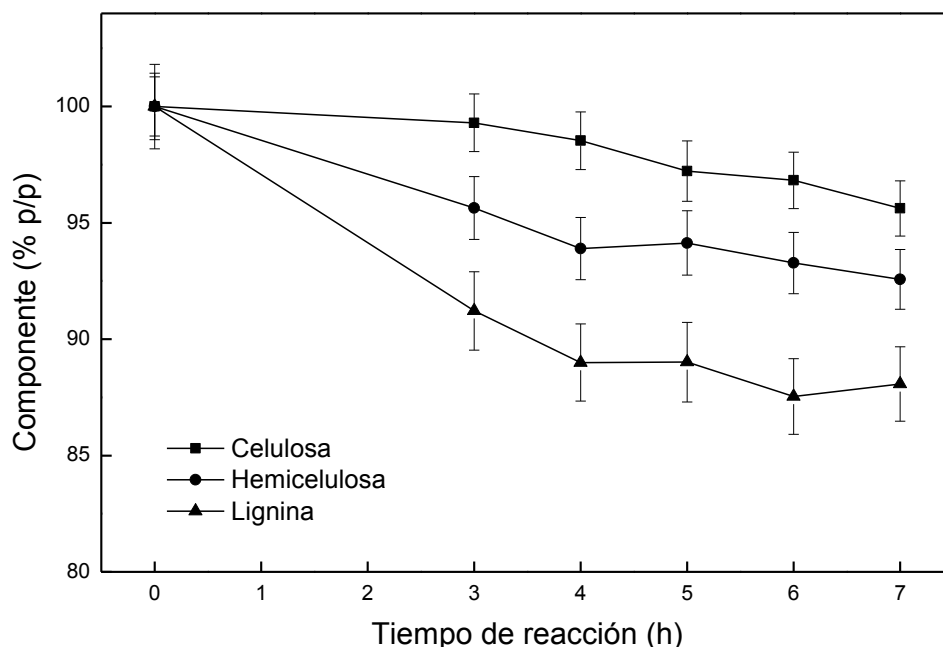


**Figura 37** Cambios de pH de una solución de  $H_2O_2$  en un medio alcalino, regulada y no regulada.

Por encima de un pH 11.5, la solubilización de las hemicelulosas se incrementa (Fang et al. 2000). De modo que al mantener el pH, se puede reducir la solubilización de hemicelulosa, evitando que la integridad de la matriz se pierda y manteniendo por tanto los materiales integrados como un alimento.

#### 7.3.1 Análisis de la fibra

Los principales componentes de la pared celular de la cascarilla se obtienen a partir del análisis secuencial con soluciones detergentes para determinar a la celulosa, hemicelulosa y lignina.



**Figura 38** Análisis de los principales componentes de la fibra de la cascarilla de arroz a diferentes tiempos de reacción.

En la Figura 38 se muestra la gráfica del material recuperado con respecto a la muestra de control (100%). Todos los datos se calculan libres de ceniza.

La pérdida de la lignina aumenta desde 8.78, 11.00, 10.99, 12.46 hasta un 12.48% aproximadamente para 3, 4, 5, 6 y 7 horas de tratamiento, respectivamente. En el caso de la hemicelulosa, la pérdida va desde un 4.36, 6.11, 5.87, 6.73 hasta un 7.43%. Para la celulosa, hay una pérdida de 0.70, 1.47, 2.78, 3.18 y 4.25%, respectivamente. En estas condiciones, la reducción de la lignina para 7 horas de tratamiento es muy baja en comparación con la presentada por otros autores en los que no se mantiene el pH durante la reacción.

Se ha demostrado, que aproximadamente la mitad de la lignina y casi toda la hemicelulosa es removida de los residuos agrícolas cuando se trata el material con una solución de peróxido de hidrógeno sin control de pH (Gould 1985b). Sin embargo, aunque el tratamiento con pH regulado remueva pequeñas cantidades de lignina, los carbohidratos se vuelven más accesibles a la degradación (Kerley et al. 1987).

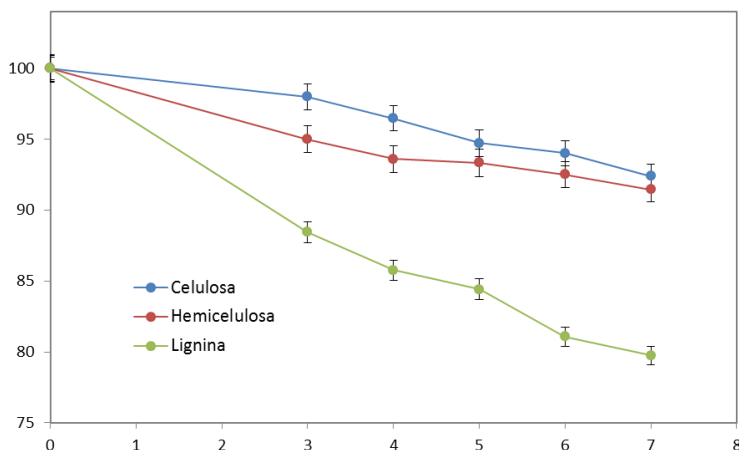
Se ha demostrado, que la cascarilla tratada con este método aumenta su absorción de agua, característica que favorece aún más la accesibilidad de la celulosa a los ataques biológicos, además



disminuye la cristalinidad de la celulosa la cual resulta favorable para su degradación (Sun et al. 2000b).

En la Figura 38, se puede observar que la relación de pérdida de lignina se hace más pequeña en relación con el tiempo de reacción. Esto puede indicar que independientemente del aumento de tiempo de reacción, la cantidad de lignina eliminada no aumentaría. Esto se debe a que al mantenerse el pH, se promueve un ataque específico de los grupos cromóforos de la lignina, por lo que existe un número limitado de enlaces que esta reacción puede remover. Para poder continuar reduciendo la cantidad de lignina, se debe incrementar el pH, pero esto provocaría la solubilización de sílice y hemicelulosa.

La comparación de los resultados de análisis de fibra con la literatura resulta compleja. Esto se debe a que en la mayoría de los trabajos no se declara si se está reportando libre de cenizas. Van Soest y colaboradores, han mencionado la necesidad de reportar la cantidad de cenizas presentes para poder comparar adecuadamente (Van Soest 2006). En la Figura 39 se muestran los resultados obtenidos pero en base seca, es decir, sin determinar la cantidad de cenizas presentes en las muestras.



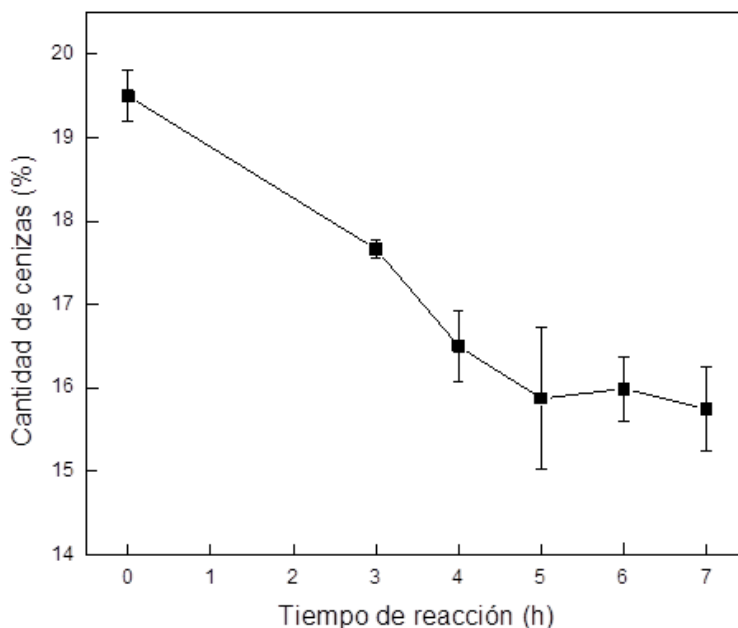
**Figura 39** Resultados de los análisis de componentes en una base seca (con ceniza)

Como se puede observar, los resultados son muy distintos a los obtenidos. Aparentemente hay una mayor pérdida de lignina que la obtenida en los resultados libres de ceniza.

## 7.4 Ceniza en la cascarilla de arroz

A fin de conocer la cantidad de sílice recuperada, se determinó la cantidad total de cenizas posterior al tratamiento peróxido alcalino. En la Figura 40 se muestra la gráfica de la ceniza recuperada. La ceniza de la cascarilla puede estar compuesta de sílice e impurezas, y al haber

reducido las impurezas metálicas, se puede considerar la cantidad de ceniza como una buena aproximación de sílice (99%).



**Figura 40** Porcentaje de cenizas de las muestras

Durante el tratamiento con la solución alcalina diluida, la sílice se separa de las fibras y se disuelve en forma de silicato de sodio o en algún compuesto complejo. Como se puede observar en la Figura 40, la reducción de sílice se incrementa conforme aumenta el tiempo de reacción. Sin embargo, en 7 horas de tratamiento, se disolvió menos del 20% de sílice. En contraste, en otras investigaciones donde el pH de la reacción no es regulado, la sílice se elimina por completo (Sun 2000b).

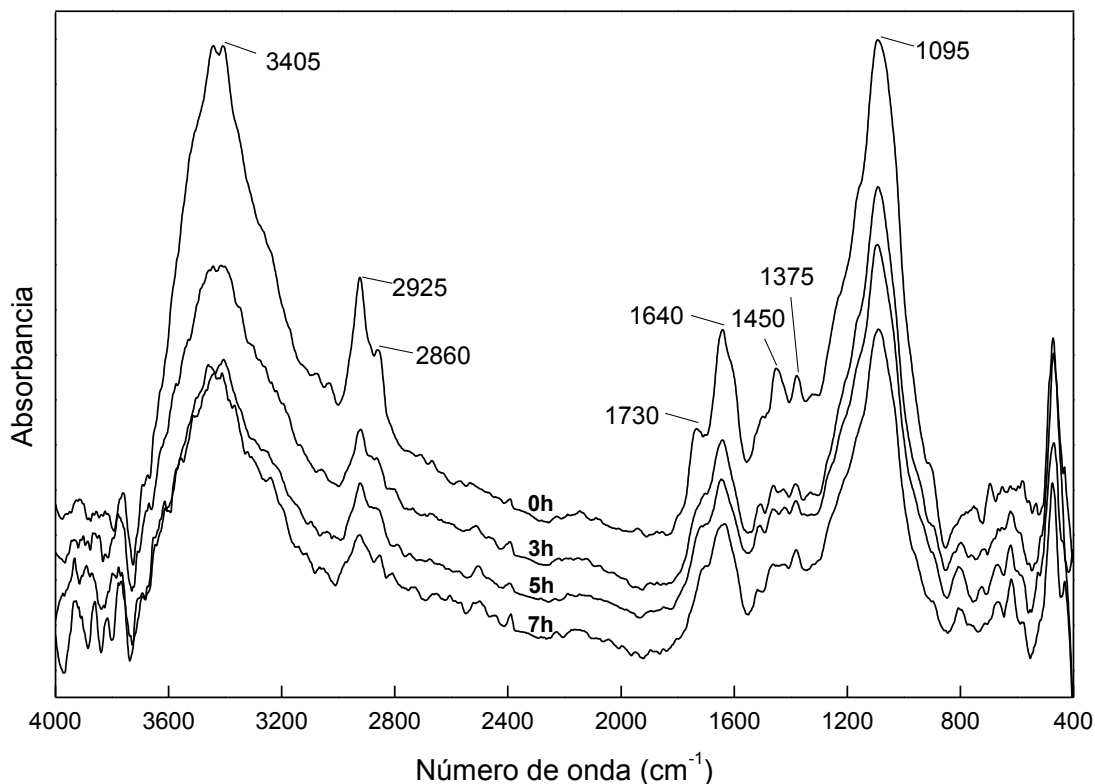
Al mantener el pH de la reacción controlado, la disolución de la sílice disminuye, debido a que en medios más alcalinos se promueve su disolución. La sílice está localizada mayormente en las células epidérmicas que se encuentran en la superficie de la cascarilla y menos del 3% de la sílice se encuentra ligada covalentemente a los polisacáridos (Patel et al. 1987; Sun et al. 2001).

## 7.5 Análisis estructural

La regulación del pH durante el tratamiento reduce la solubilización de la hemicelulosa y la de sílice, pero también provoca una baja pérdida de lignina durante el tratamiento (Figura 38).

Como se ha citado anteriormente, el tratamiento peróxido alcalino con pH controlado, promueve la eliminación de grupos cromóforos presentes en la lignina (como C=C, C=O). De modo que únicamente se están rompiendo algunos enlaces de la lignina en vez de remover gran parte del componente.

En la Figura 41, se muestra la gráfica de los espectros infrarrojo para cascarilla con 0, 3, 5 y 7 horas de tratamiento peróxido alcalino con un pH controlado de 11.5, a temperatura ambiente.



**Figura 41** Espectros infrarrojos de la cascarilla tratada con una solución de peróxido alcalino con pH controlado.

Hay una reducción en la intensidad de casi todas las bandas, lo que está en acuerdo con el análisis de los componentes de la fibra (Figura 38). A 3 horas de tratamiento se observa la mayor tasa de pérdida. En las siguientes horas, se tienen pérdidas de los componentes, pero a una tasa menor.

Existe además, un cambio mayor para la banda ubicada alrededor de  $1450\text{cm}^{-1}$ , que puede estar relacionada con las vibraciones del grupo metilo en la cadena lateral del aromático de la lignina (Chen et al. 2010; Fang and Ma 2006; Labbé, Rials, and Kelley 2006). Esto puede deberse a la oxidación de las cadenas laterales de los aromáticos durante el tratamiento (Genieva et al. 2008).

La intensa banda de absorción alrededor de  $3405\text{cm}^{-1}$  puede ser atribuida a las vibraciones de estiramiento del hidróxido libre y enlazando con hidrógeno (OH) en las moléculas de agua y en los

grupos OH presentes en la celulosa, hemicelulosa y lignina (Fang and Ma 2006; Genieva et al. 2008). Las bandas de absorción entre  $3000$  y  $2830\text{cm}^{-1}$  pueden estar asociadas a las vibraciones de estiramiento de los grupos alifáticos en la celulosa, hemicelulosa y lignina (Fang and Ma 2006; Genieva et al. 2008; Larkin 2011). La banda pequeña en  $1730\text{cm}^{-1}$  puede estar atribuida al estiramiento del grupo carbonilo (C=O) en la cetona conjugada, aldehídos y ácido carboxílico. Estos grupos carbonilo se encuentran principalmente relacionados a la hemicelulosa (Agarwal and Atalla 2010; Chen et al. 2010; Larkin 2011). La banda en  $1640\text{cm}^{-1}$  en ocasiones se relaciona con vibraciones de deformación de las moléculas del agua (Ang et al. 2012; Larkin 2011), pero también puede estar asociada a las cetonas conjugadas del estiramiento C=O (Chen et al. 2010; Fang and Ma 2006). Hay una reducción de esta banda debido al ataque del anión hidróperóxido en las cetonas conjugadas (Pan, Lachenal, and Lapierre 1994). La gran intensidad de la banda entre  $1300$  y  $900\text{cm}^{-1}$  se puede deber a la superposición del siloxano Si-O-Si y las vibraciones de estiramiento de C-O, C-C y C-OH en la celulosa, hemicelulosa y lignina (Agarwal and Atalla 2010; Ang et al. 2012; Chen et al. 2010; Genieva et al. 2008; Labbé et al. 2006; Larkin 2011)

## 7.6 Cultivos de colémbolos

Los colémbolos utilizados en los experimentos corresponden a la especie *Folsomia candida* (Willem 1902). Los artrópodos fueron identificados por la Dra. Gabriela Castaño Meneses, en el laboratorio de Laboratorio de Ecología y Sistemática de Microartrópodos del Departamento de Biología, coordinado por el Dr. José Guadalupe Palacios Vargas, en la Facultad de Ciencias, UNAM.

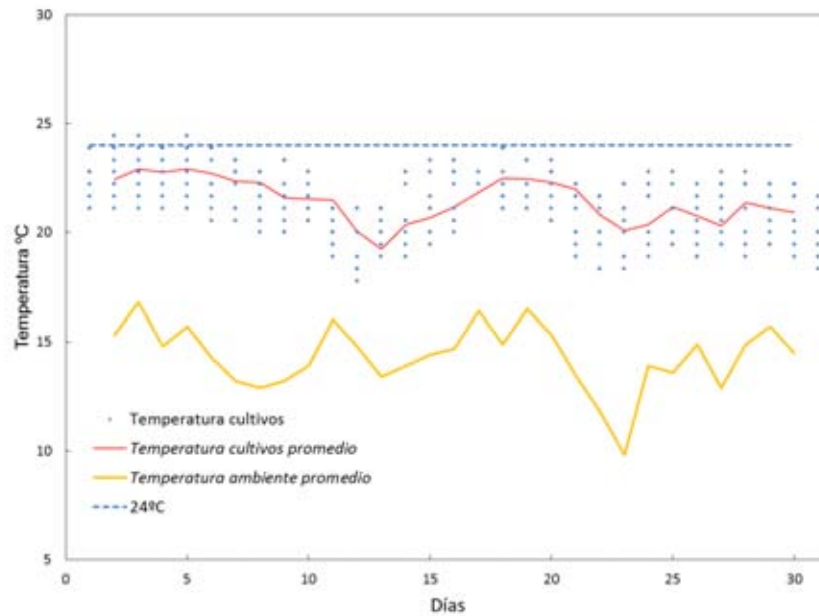
### 7.6.1 Condiciones de temperatura y humedad

Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente. En la Figura 42 se muestra la gráfica de la temperatura promedio diaria del cultivo en comparación con la temperatura ambiente. Los puntos representan las temperaturas del cultivo a diferentes horas del día.

En la Figura 42 se puede observar que aunque la temperatura del cultivo no es controlada, los cambios bruscos de la temperatura ambiente afectan muy poco al cultivo, el cual se mantiene a una temperatura mayor, pero más. De hecho las temperaturas máxima y mínima ambiente (no se muestran en la gráfica), alcanzaron los  $27$  y  $3^{\circ}\text{C}$  respectivamente.

Como se puede observar, la mayor parte del tiempo se mantiene una temperatura menor a  $24^{\circ}\text{C}$ . En estas condiciones el promedio de vida de *F. candida* es de alrededor de 111 días (Fountain and Hopkin 2005). A una temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$  les toma de 21 a 24 días llegar a la sexta o adulto, etapa donde alcanzan la madurez sexual. Ponen alrededor de 30 a 50 huevos que tardan de 7 a 10 días

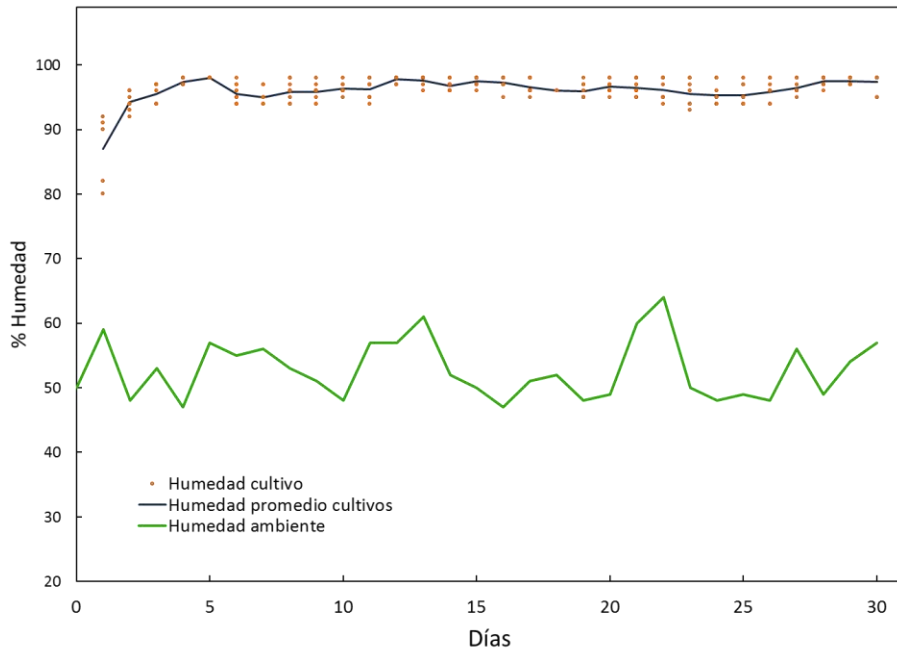
en salir del cascarón. Sin embargo, a mayores temperaturas el tiempo de las diferentes etapas se reduce.



**Figura 42** Temperatura de los cultivos, comparada con la temperatura promedio ambiental

Por otro lado, mantener una alta humedad en el cultivo es una de las condiciones más importantes. Los colémbolos pueden sobrevivir con muy poco alimento o incluso sin alimento por largos periodos de tiempo. Sin embargo, en condiciones de humedad baja pueden morir en solo unas horas.

Para asegurar la supervivencia de los colémbolos se mantuvieron condiciones de humedad alta durante todo el cultivo, tanto por preservar a los colémbolos como propiciar las mejores condiciones para su desarrollo. En la Figura 43 se muestra gráfica la humedad relativa del ambiente comparada con la humedad relativa del cultivo promedio. Los puntos corresponden las humedades medidas durante el día.



**Figura 43** Condiciones de humedad en el cultivo comparada con la humedad ambiental

Como se observa, la humedad del cultivo es mucho mayor que la ambiental, la cual es muy baja para los colémbolos.

Además, se puede apreciar que los cambios en la humedad son muy pocos, en general se mantiene entre 95 y 98% un vez que se estabiliza. Esto promueve tanto la supervivencia como el desarrollo de los colémbolos.

### 7.6.2 Reproducción en los cultivos en condiciones de laboratorio

Los 5 cultivos fueron monitoreados en periodos de 5 días aproximadamente, para completar un periodo total de 30 días. En el día 1, los cultivos iniciaron con 8-10 colémbolos aproximadamente. A los 10 días posteriores al inicio del cultivo, pudieron observar huevos en diferentes partes del cultivo. En la

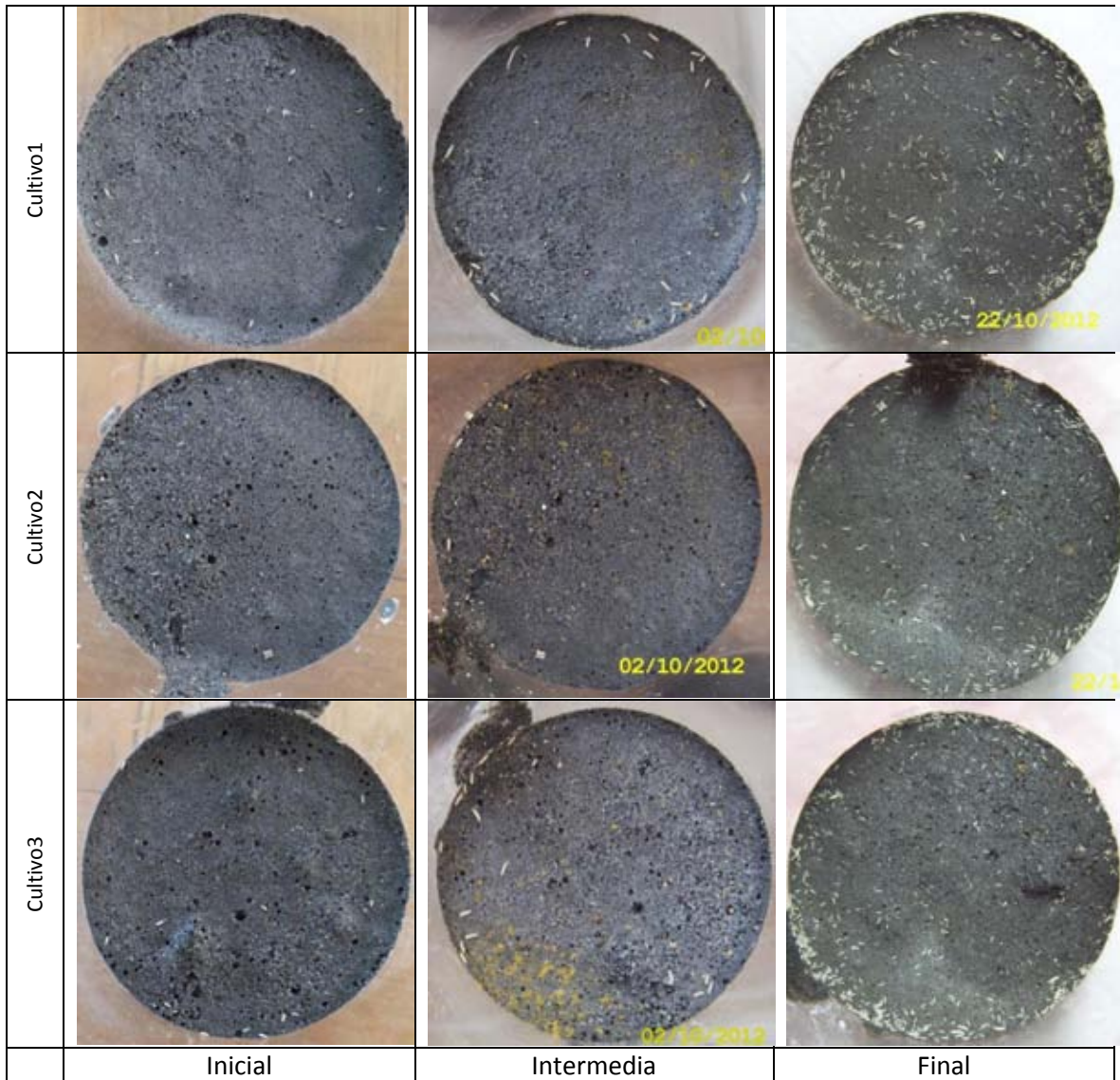
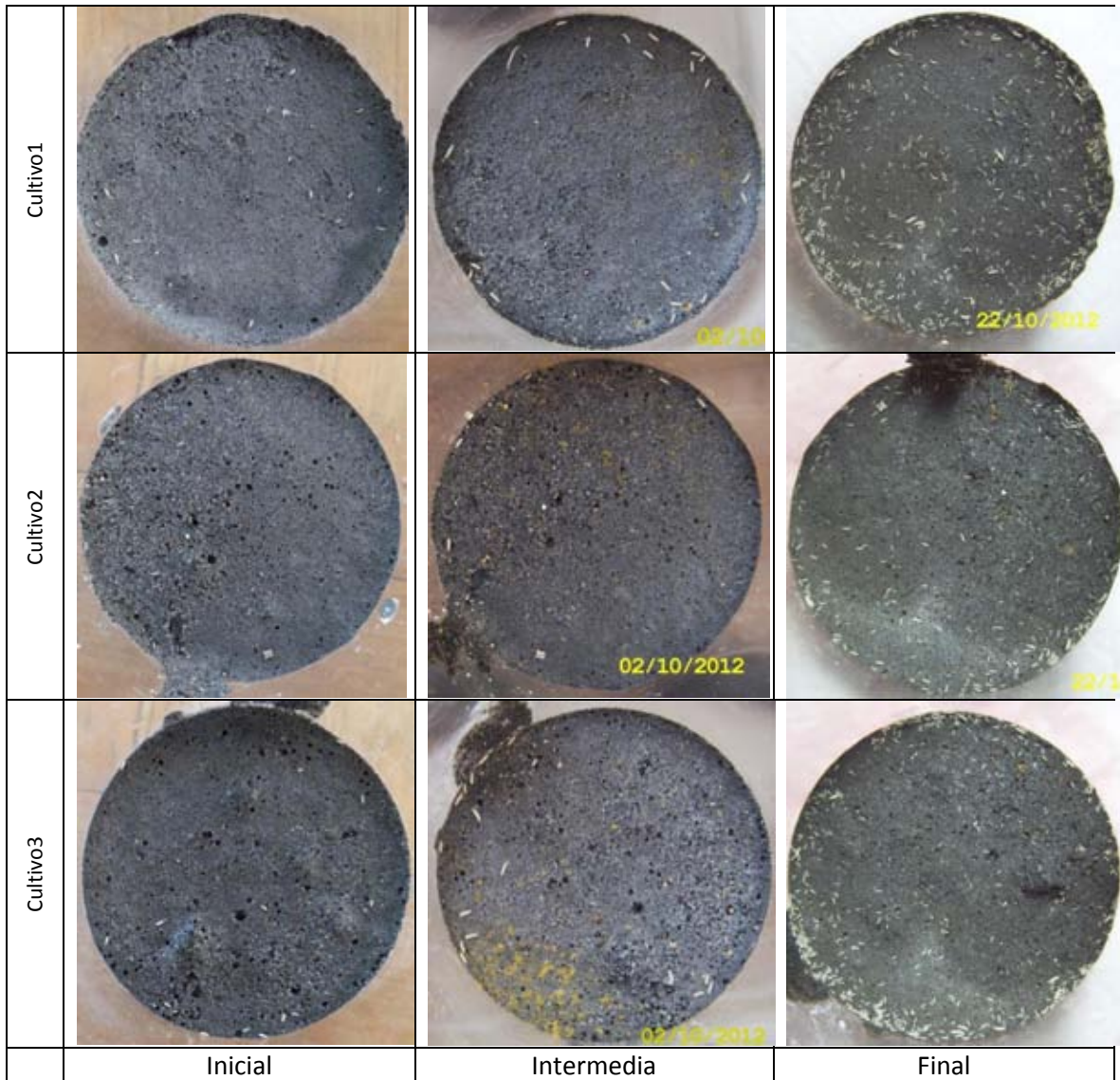


Figura 44, los huevos se observan como zonas color amarillo en las observaciones intermedias y finales. En los días posteriores los huevecillos eclosionaron en la mayoría de los cultivos, y se continuaron observando huevecillos en los cultivos.

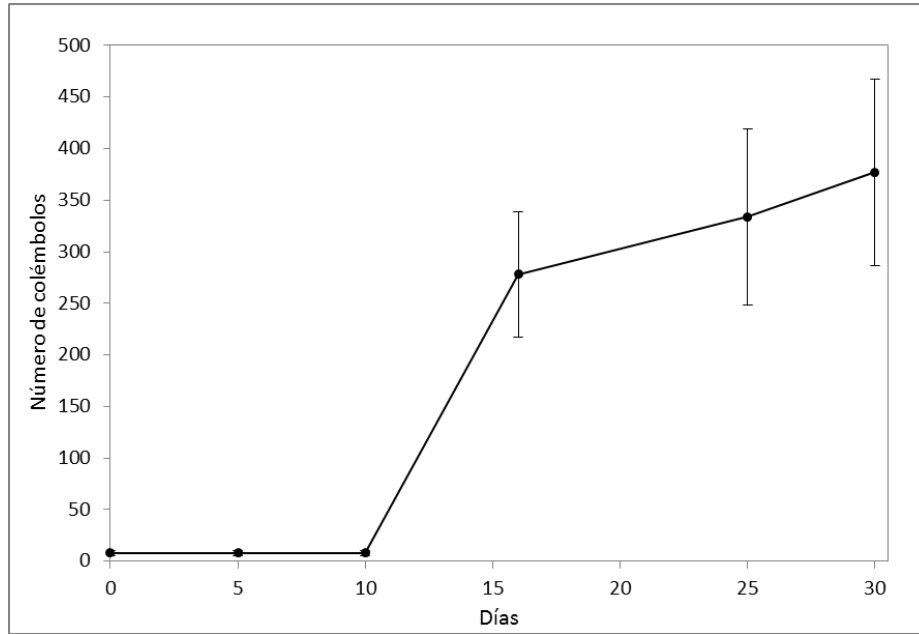
Los colémbolos fueron contabilizados por medio de fotografías, las cuales fueron procesadas para posteriormente contabilizar con el programa ImageJ.



**Figura 44 Muestra de observaciones de los cultivos en diferentes fases del periodo**

En la gráfica de la Figura 45 se muestra el crecimiento promedio de los colémbolos en los cultivos. Como se puede observar, el crecimiento presenta una curva sigmoidea. Esto muestra que inicialmente el incremento de los colémbolos es exponencial, debido a que no existen otras limitaciones en el medio. Sin embargo cuando la población se incrementa, el crecimiento se reduce debido que empiezan a intervenir un mayor número de factores.

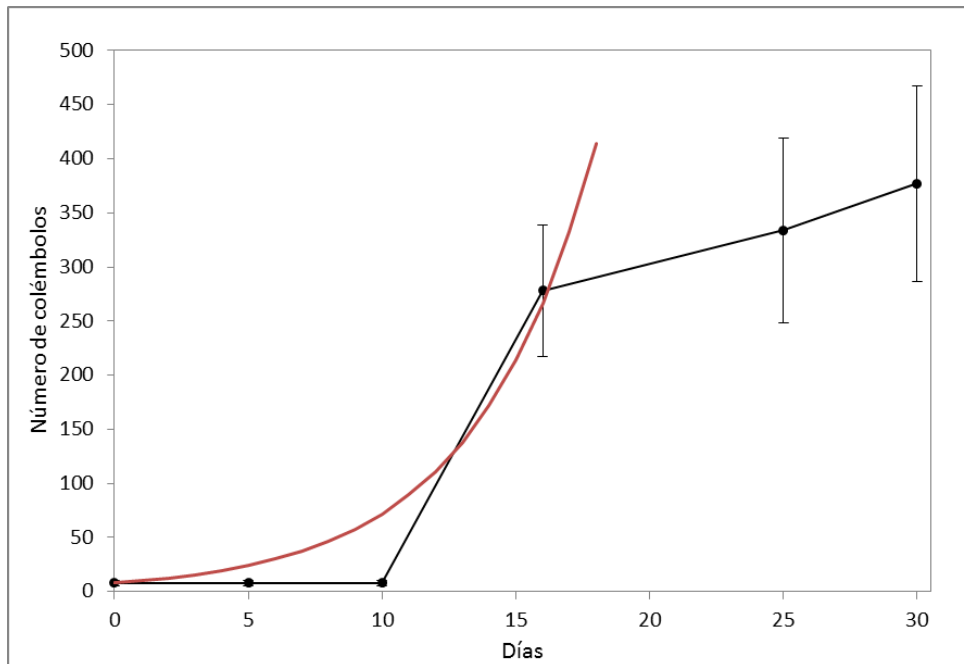




**Figura 45** Crecimiento promedio de los cultivos en condiciones de laboratorio

Existen diversos modelos que pueden ajustarse a este tipo de crecimiento, sin embargo el interés principal es el crecimiento que presenta al inicio del cultivo, el de tipo de exponencial.

Tomando en cuenta la parte de crecimiento exponencial y modelando los datos, obtenemos la siguiente aproximación mostrada en la Figura 46.



**Figura 46** Aproximación de una función exponencial a la zona de crecimiento inicial

La exponencial que se aproxima al crecimiento que presentan los cultivos al inicio es  $y = 8e^{0.2192x}$ .

### 7.6.3 Reproducción en los cultivos de cascarilla de arroz

Al finalizar el periodo de 30 días, se observaron colémbolos vivos en los cultivos con sustratos de cascarilla tratada y sin tratar, incluso en los cultivos sin cascarilla (con agua).

Para el caso de los cultivos sin cascarilla de arroz, los colémbolos se encuentran sin alimento, por lo que se podría predecir que los organismos morirían en estas condiciones. Sin embargo, los colémbolos entran en un estado inactivo, en cual se mueven muy poco. En este estado pueden sobrevivir largo tiempo sin alimento.

En la Figura 47 se pueden observar diferentes tipos de cultivos de colémbolos sin cascarilla, con cascarilla no tratada y finalmente con cascarilla tratada al finalizar el periodo.



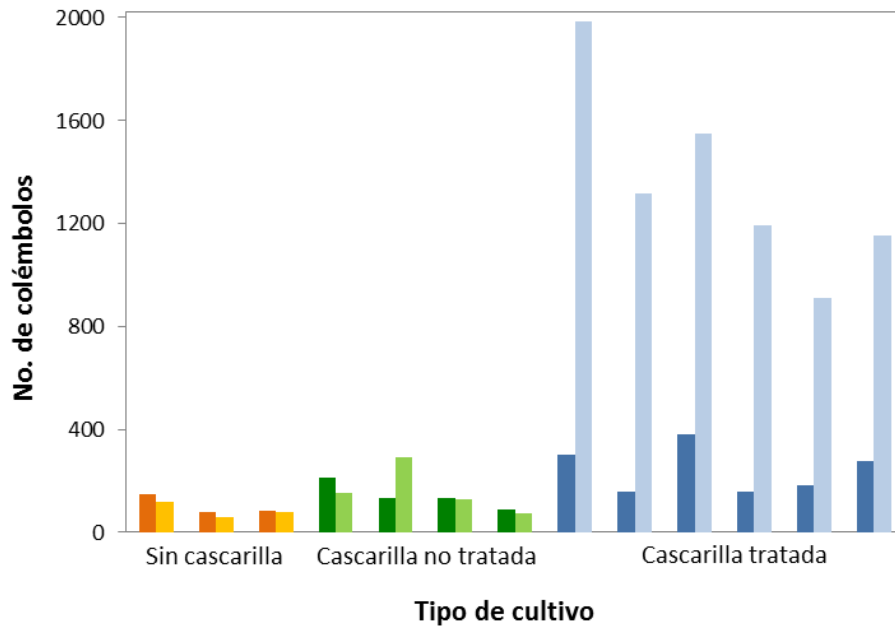
**Figura 47** Cultivos de colémbolos, a) sin cascarilla, b) con cascarilla sin tratar, c) con cascarilla tratada

El número de colémbolos en los cultivos, fue determinado por medio de fotografías. Cada una de las fotografías fue procesada digitalmente, contrastando la imagen y posteriormente seleccionado los colémbolos adultos y jóvenes (determinados por tamaño), por medio de puntos. Para el conteo se utilizó el programa ImageJ.

En cultivos con una gran cantidad de colémbolos jóvenes, y que se encontraban distribuidos homogéneamente, se determinó la densidad de organismos en varias áreas menores y posteriormente se realizó la estimación total de colémbolos en toda la superficie donde se encontraban presentes.

Al comparar los colémbolos iniciales y finales de los cultivos, se puede ver más claramente la reproducción por tipo de cultivo. En la Figura 48 se muestran el número de colémbolos en cada

cultivo. Aunque el número de colémbolos no es fijo, debido a la dificultad de manipularlos, se puede observar una tendencia clara en los cultivos con cascarilla.



**Figura 48** Comparación de los colémbolos iniciales y finales en los cultivos de cascarilla de arroz

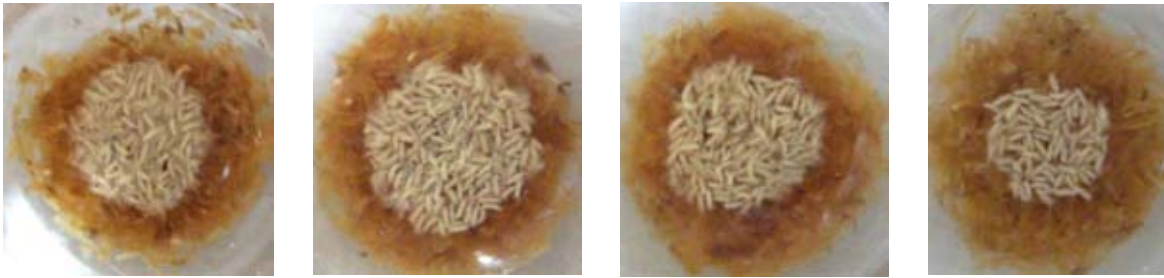
En los cultivos sin cascarilla de arroz, se ve una pequeña disminución en el número de colémbolos. Esto se debe a que los colémbolos permanecieron en un estado de hibernación, y por tanto la mayoría de ellos sobrevivieron bajo estas condiciones. En la Figura 49 se pueden observar los tres cultivos al finalizar el periodo.



**Figura 49** Colémbolos en cultivos sin sustrato (solo agua)

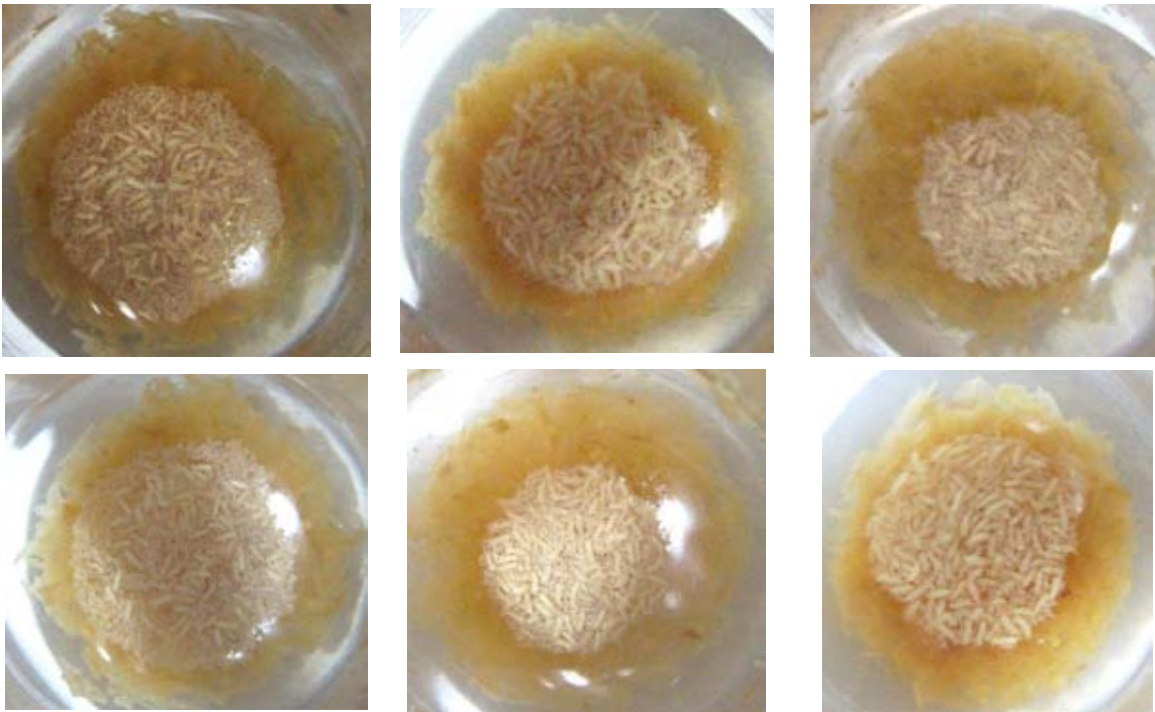
En los cultivos de cascarilla no tratada se observa un incremento en dos de los cultivos y un decremento en los otros dos. El incremento de colémbolos en los cultivos de este sustrato se encontraban conformados en gran parte por organismos jóvenes. La reproducción, podría indicar que los colémbolos se estaban desarrollando satisfactoriamente en esas condiciones, sin embargo,

solo en dos de los cultivos se observa el incremento. En la Figura 50 se muestran los cultivos al finalizar el periodo.



**Figura 50 Colémbolos en sustratos de cascarilla de arroz sin tratar**

En el caso de los cultivos en sustratos cascarilla de arroz tratada, hay un gran incremento en el número final de colémbolos. Aunque es variable, corresponde a un aumento de casi 500% en promedio. De manera similar que en el caso de los cultivos de cascarilla no tratada, el incremento está conformado por colémbolos jóvenes. En la Figura 51 se muestran los cultivos al finalizar el periodo.



**Figura 51 Colémbolos en sustratos de cascarilla de arroz tratada**

Este incremento en la reproducción de los colémbolos, puede indicar que los colémbolos se encuentran en condiciones adecuadas de alimento, temperatura y humedad.

En los cultivos con sustratos de cascarilla tratada, también se observaron huevecillos. Estos eclosionan en un periodo 7-10 días. En la Figura 52 pueden observarse los huevos.



**Figura 52 Huevos de colémbolos en los tubos de cultivo**

Como se había mencionado anteriormente, a falta de alimento, los colémbolos podrían alimentarse de cualquier material de su entorno, esto incluiría huevecillos, mudas y colémbolos muertos. En estos casos, el número de colémbolos solo podría disminuir. De modo que el incremento en el número de colémbolos, podría indicar que la cascarilla tratada está siendo aprovechada por los colémbolos.

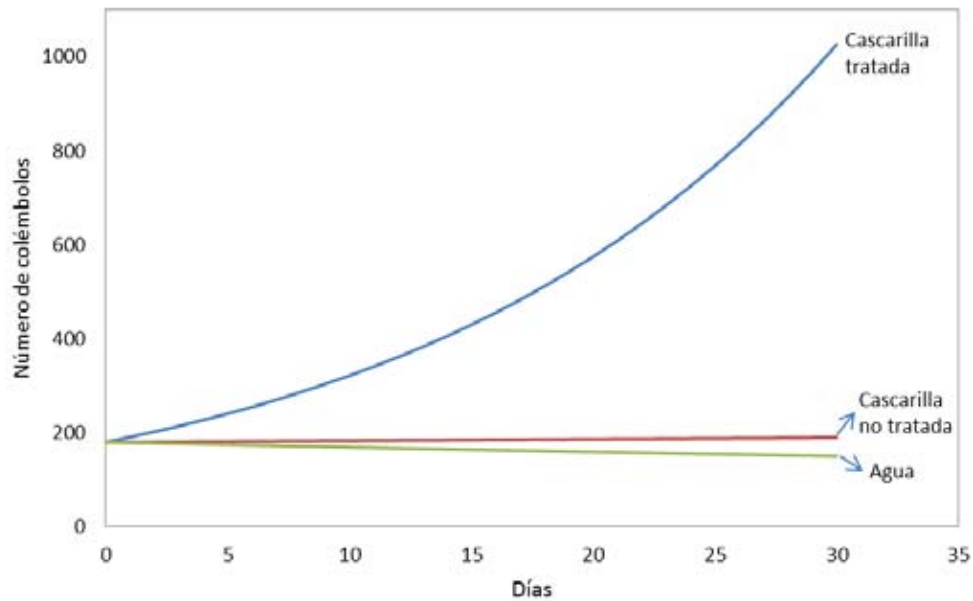
Cabe destacar que los colémbolos en sustratos con cascarilla se encontraban en movimiento en las observaciones intermedias realizadas (cada 6 días), por lo que los colémbolos no se encontraban en estado inactivo.

Para cada uno de los cultivos se realizó una estimación del crecimiento exponencial, con la que se obtuvo la tasa de crecimiento  $r$  para cada caso ( $y = ae^{rx}$ ). En la Tabla 4 se muestran los valores de  $r$  para cada uno de los cultivos con sustrato de cascarilla no tratada, sin tratar o si sustrato (solo agua).

		Sustrato		
		Cascarilla tratada	Cascarilla no tratada	Agua
Cultivo	1	0.0625	-0.0105	-0.0082
	2	0.0705	0.0258	-0.0072
	3	0.0467	-0.0018	-0.0029
	4	0.0675	-0.0064	
	5	0.0534		
	6	0.0476		
	<b>Promedio</b>	<b>0.0580</b>	<b>0.0018</b>	<b>-0.0061</b>
	Desviación estándar	0.0093	0.0142	0.0023

**Tabla 4 Valores de la tasa de crecimiento  $r$  para cada caso.**

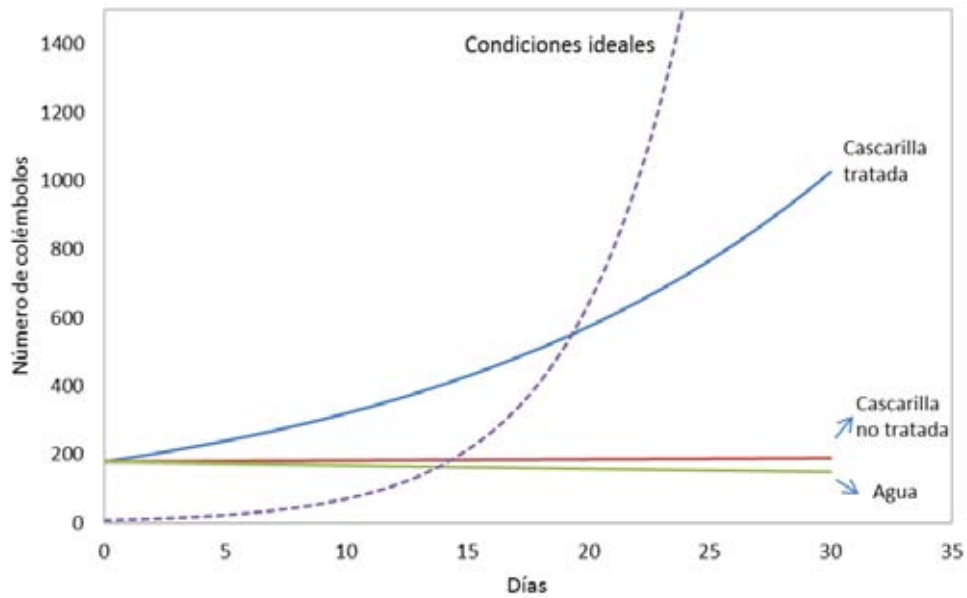
Los valores negativos en la tabla representan decremento en el número de colémbolos. Para los tres casos se obtuvieron los valores promedio de crecimiento. La Figura 53 se muestra gráficamente el crecimiento promedio de los cultivos en los diferentes sustratos.



**Figura 53 Crecimiento promedio de los colémbolos en los diferentes tipos de sustratos**

Como se había discutido anteriormente, hay una clara diferencia en la reproducción que se obtuvo en los experimentos con cascarilla de arroz tratada.

Es claro que la cascarilla tratada fue aprovechada por los colémbolos, debido a la reproducción en el cultivo. Sin embargo, al comparar el crecimiento de los cultivos con el desarrollado por los colémbolos en condiciones ideales de laboratorio, se puede observar que el crecimiento en condiciones ideales sigue siendo elevado (Figura 54). Esto muestra que aunque los colémbolos han aprovechado la cascarilla tratada, la falta de otro tipo de alimentos limita su crecimiento.



**Figura 54** Crecimiento promedio de los colémbolos comparado con el crecimiento en condiciones ideales de laboratorio

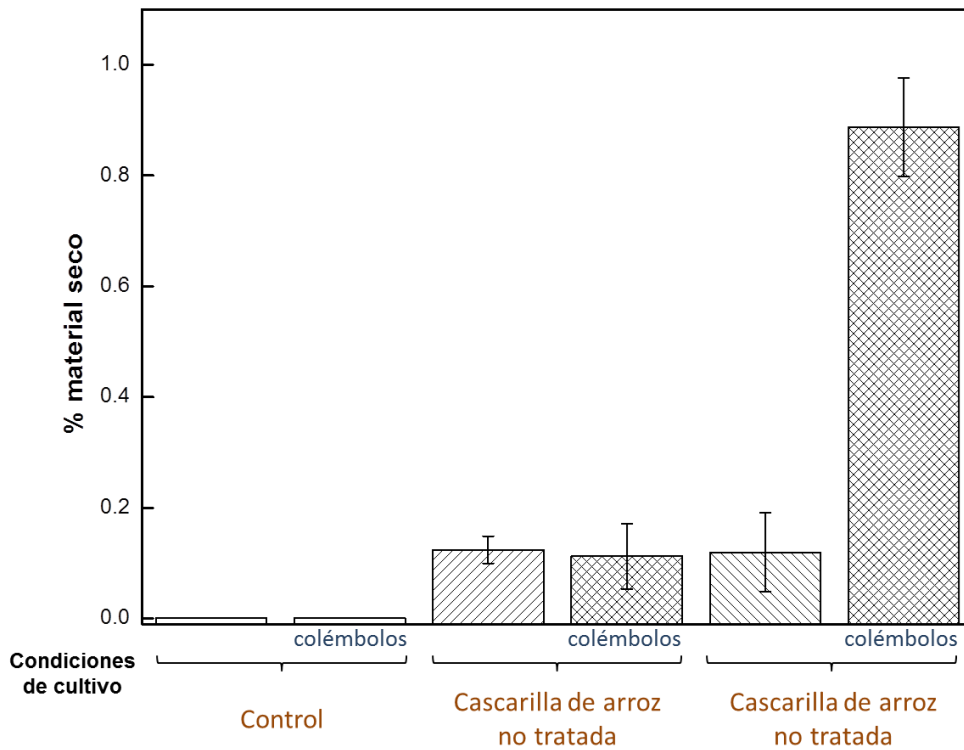
#### 7.6.4 Extracción de muestras

La muestra líquida extraída de los cultivos, fue evaporada y posteriormente pesada. El peso promedio del residuo obtenido en relación con el peso del sustrato inicial se muestra en la Tabla 5.

Tipo de cultivo	% Promedio
Blanco	0.0000
Colémbolos (CB)	0.0000
Cascarilla no tratada (CNT)	0.1239
Cascarilla no tratada con colémbolos (CNT+CB)	0.1124
Cascarilla tratada (CT)	0.1195
Cascarilla tratada con colémbolos (CT+CB)	0.8880

**Tabla 5** Porcentaje del residuo seco promedio en relación al sustrato inicial, obtenido al evaporar las muestras extraídas de los cultivos

Aunque el peso de las muestras obtenidas es muy pequeño, existe una diferencia relativa importante. En la Figura 55 se muestra la gráfica de la Tabla 5, donde se aprecia más claramente los resultados obtenidos.



**Figura 55** Porcentaje de residuo seco promedio obtenido al evaporar las muestras extraídas de los cultivos con cascarilla de arroz

El cultivo control, muestra cantidades despreciables de material. Este tubo que se mantuvo con solo agua. De igual manera, el cultivo con agua y colémbolos, muestra cantidades despreciables de material. En este cultivo, el único material que pudo haberse encontrado fueron mudas de colémbolos, pero una cantidad tan pequeña de material no se ve reflejado en los resultados.

En los cultivos con cascarilla no tratada con y sin colémbolos, y el de cascarilla tratada sin colémbolos se observa la presencia de material. Estos residuos pueden estar presentes debido a la descomposición natural del material orgánico. El cultivo no es aséptico, de modo que pueden existir microorganismos del ambiente que degraden el material. En los tres tipos de cultivos se obtienen residuos similares, esto muestra que los colémbolos no fueron capaces de degradar la cascarilla no tratada.

Del mismo modo, el residuo seco obtenido de los cultivos con cascarilla tratada y colémbolos, muestra que existe una degradación de la cascarilla debido a la presencia de los colémbolos.

Esto indica que la remoción de algunos enlaces presentes en la lignina, permite la degradación de las paredes celulares de la cascarilla de arroz.



Por otro lado harían falta más pruebas para determinar con mayor precisión la degradación de la cascarilla. Debido a que se obtuvieron cantidades muy bajas de material de los cultivos.

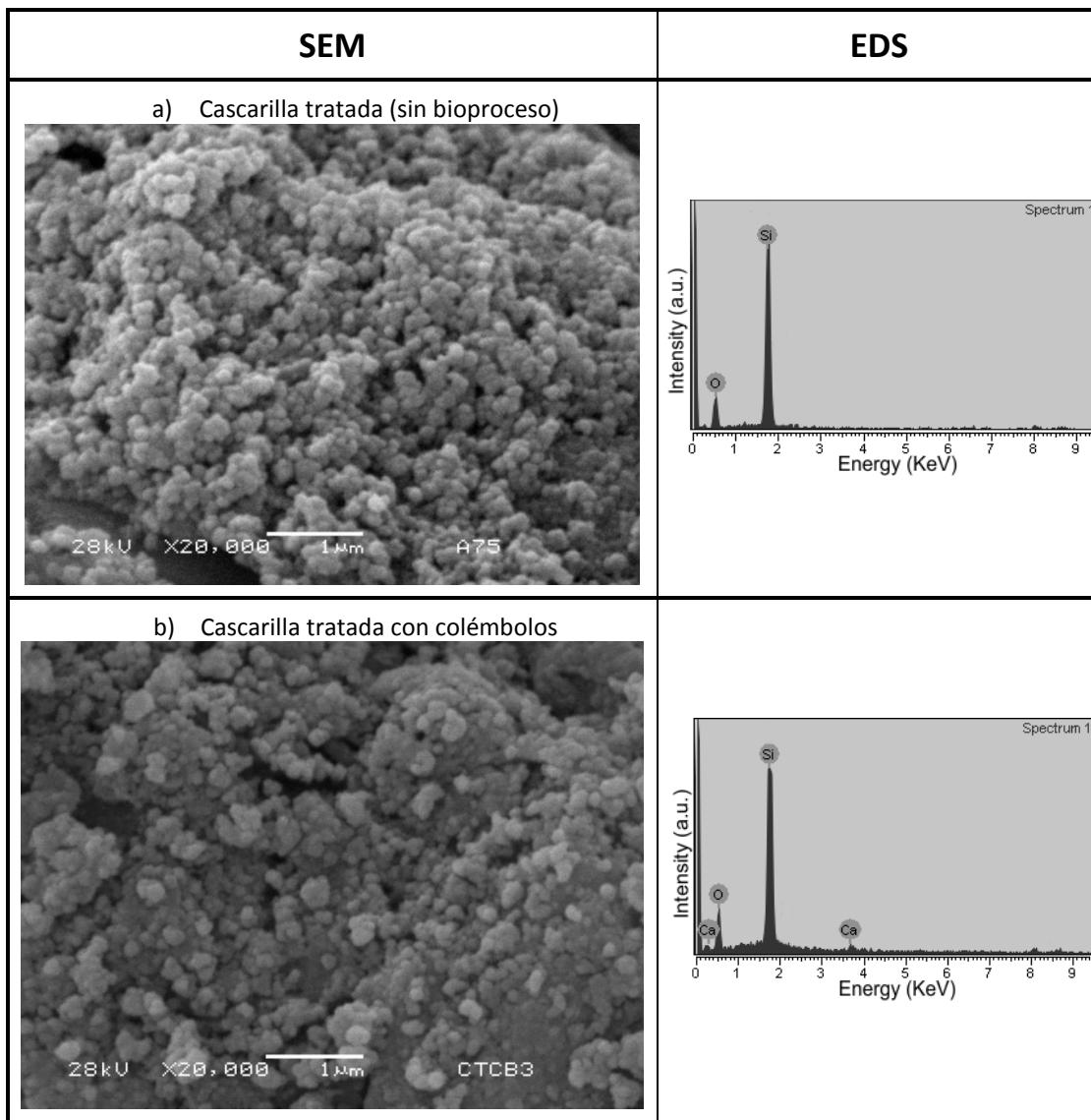
#### **7.6.5 Caracterización de la sílice en los cultivos de colémbolos**

Por medio de microscopía electrónica, se analizó el residuo seco proveniente de la evaporación de las muestras líquidas extraídas de los cultivos. Esto, después exponer cascarilla de arroz previamente tratada con peróxido alcalino con pH controlado durante 7 horas, a la presencia de colémbolos un periodo de 30 días.

Como se había mencionado anteriormente, las muestras fueron calcinadas a fin de poder analizar el contenido inorgánico extraído de los cultivos.

En la Figura 56 se muestran las micrográficas SEM obtenidas de los residuos calcinados de los cultivos de colémbolos, para el caso de la cascarilla tratada y sin tratar con colémbolos. Para fines comparativos, se analizó una muestra calcinada de cascarilla de arroz tratada durante 7 horas con una solución peróxido alcalina con pH controlado que no fue expuesta a los cultivos de colémbolos.

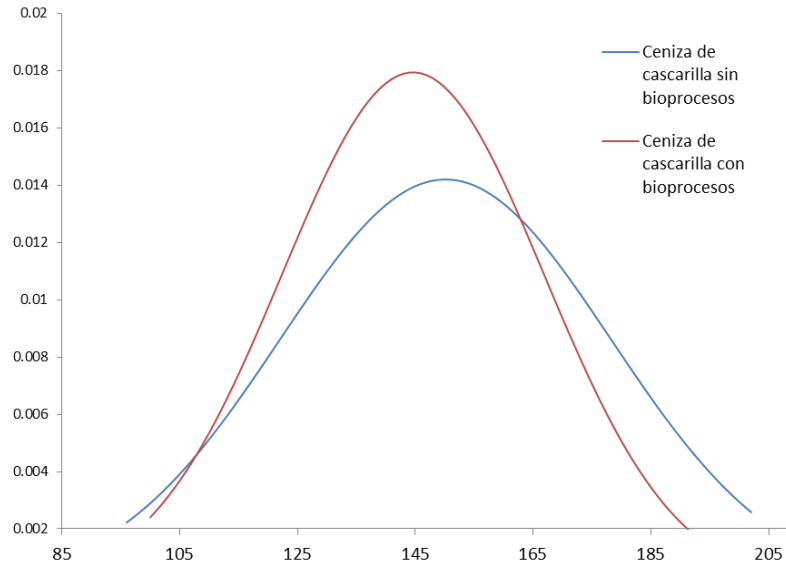
A la derecha de las imágenes se muestra el espectro EDS correspondiente, que muestra la composición de la muestra observada.



**Figura 56** Micrografías de los residuos calcinados de los cultivos de cascarilla de arroz comparados con cascarilla calcinada sin bioprocesos.

En la Figura 56a se observan partículas semiesféricas de tamaños entre 100-210nm, con un tamaño promedio de 150nm. Se utilizó el programa Lince para determinar el tamaño promedio de las partículas en las imágenes de SEM.

En la Figura 56b, se encuentran partículas de entre 75-200nm y grandes aglomerados. El tamaño promedio de estas partículas es de 135nm, un tamaño ligeramente menor de las partículas. Sin embargo, aunque la diferencia de tamaño no es apreciable, al realizar un análisis estadístico (Figura 57), se observa una mayor dispersión en los valores de la muestra que no estuvo en presencia de colémbolos y por el contrario, se observa una menor dispersión en los tamaños de partículas en el caso de la muestra de ceniza cascarilla que fue expuesta a los colémbolos.



**Figura 57 Distribución de tamaños de partícula**

Estadísticamente, el 49% de las partículas provenientes de la ceniza de cascarilla de arroz con bioproceso tienen un tamaño menor a 135nm, en comparación con la ceniza de cascarilla de arroz sin bioprocesos donde el 33.6% tiene un tamaño menor a 135nm. Esta disminución de tamaño podría atribuirse a la presencia de los colémbolos en los cultivos.

## 8 Conclusiones y recomendaciones

De acuerdo a los resultados mostrados, se obtuvieron partículas de sílice por medio de bioprocesos llevados a cabo por los colémbolos (*Folsomia candida*) alimentados con cascarilla de arroz tratada. Las partículas tienen un tamaño promedio de 135nm, que son 15nm menores al tamaño promedio de la cascarilla sin bioprocesos. Aunque la diferencia de tamaño es del 10%, el 49% partículas provenientes de la cascarilla de arroz con bioproceso tienen un tamaño menor a 135nm, a diferencia de un 33.6% de las partículas provenientes de la cascarilla de arroz sin bioproceso. Aunque existió una diferencia de tamaño de 15nm debido al bioproceso, la mayor parte de las partículas (90%) tiene un tamaño mayor a 100nm, por lo que no se pueden considerar en el rango de nanopartículas.

Por otro lado, se pudo determinar que el tratamiento peróxido alcalino llevado a cabo a la cascarilla de arroz permitió una degradación 85% mayor respecto a la cascarilla sin tratamiento. Si bien, el tratamiento peróxido alcalino llevado a cabo a temperatura ambiente y manteniendo el pH 11.5 óptimo durante toda la reacción, remueve poca cantidad de lignina (12.48%), la eliminación de los grupos cromóforos presentes en la lignina permitió incrementar la biodisponibilidad de la cascarilla de arroz.

Además, el tratamiento peróxido alcalino permitió preservar la mayor parte de la pared celular, ya que hubo una reducción de 7.43% de hemicelulosa y 4.25% de celulosa. De los resultados del tratamiento, también se desprende que si las condiciones de reacción se cambiaran para remover una mayor cantidad de lignina, también lo harían los carbohidratos y la sílice, provocando la separación de los componentes, lo que no permitiría someterlo a bioprocesos.

Si bien los colémbolos lograron degradar la cascarilla de arroz, esto corresponde a menos de 1% del peso inicial del sustrato, por lo que la obtención de partículas de sílice es menor al 1% una vez removido el material orgánico. Aunque este resultado muestra una baja eficiencia en la producción de partículas de sílice, no se descarta la posibilidad de proponer cambios a la metodología que permitan obtener partículas de sílice en mayores proporciones a las obtenidas en este estudio. Por otro lado, es necesario implementar un proceso físico que permita recuperar las partículas del material degradado.

## 9 Referencias

- Abril, D, E Navarro, and a Abril. 2009. "La Paja de Arroz: Consecuencias de Su Manejo Y Alternativas de Aprovechamiento." *Revista Agronomía U. Caldas* 17 (2): 69–79.
- Agarwal, Umesh P., and Rajai H. Atalla. 2010. "Vibrational Spectroscopy." in *Lignin and Lignans: Advances in chemistry*, edited by Cyril Heitner, Donal R. Dimmel, and John A. Schmidt. Boca Raton: CRC Press.
- Ang, Teck Nam, Gek Cheng Ngoh, Adeline Seak May Chua, and Min Gyu Lee. 2012. "Elucidation of the Effect of Ionic Liquid Pretreatment on Rice Husk via Structural Analyses." *Biotechnology for biofuels* 5(1):67. Retrieved January 13, 2014 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3499433&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Ankom. 1997a. "Method for Determining Acid Detergent Fiber." in *Operator's Manual ANKOM Fiber Analyzer (A200, A200I)*. Ankom Technology.
- Ankom. 1997b. "Method for Determining Neutral Detergent Fiber." in *Operator's Manual ANKOM Fiber Analyzer (A200, A200I)*. Ankom Technology.
- AOAC. 2000. "Fiber (acid Detergent) and Lignin in Animal Feed (973.18)." in *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists.
- Arcos, CA, D. Maciáz Pinto, and JE Rodríguez Páez. 2007. "La Cascarilla de Arroz Como Fuente de SiO<sub>2</sub> Husk of Rice as Source of SiO<sub>2</sub>." *researchgate.net* 41:7–20. Retrieved June 27, 2014 ([http://www.researchgate.net/publication/237693856\\_La\\_cascarilla\\_de\\_arroz\\_como\\_fuente\\_de\\_SiO2\\_Husk\\_of\\_rice\\_as\\_source\\_of\\_SiO2/file/50463529f37e915a0a.pdf](http://www.researchgate.net/publication/237693856_La_cascarilla_de_arroz_como_fuente_de_SiO2_Husk_of_rice_as_source_of_SiO2/file/50463529f37e915a0a.pdf)).
- Bansal, V., a. Sanyal, D. Rautaray, a. Ahmad, and M. Sastry. 2005. "Bioleaching of Sand by the Fungus *Fusarium Oxysporum* as a Means of Producing Extracellular Silica Nanoparticles." *Advanced Materials* 17(7):889–92. Retrieved June 12, 2011 (<http://doi.wiley.com/10.1002/adma.200401176>).
- Bansal, Vipul, Absar Ahmad, and Murali Sastry. 2006. "Fungus-Mediated Biotransformation of Amorphous Silica in Rice Husk to Nanocrystalline Silica Fungus-Mediated Biotransformation of Amorphous Silica in." *Journal of the American Chemical Society* 128:14059–66.
- Bidlack, Jim, Mike Malone, and Russell Benson. 1992. "Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in Plants." *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science* 72:51–56.
- Brandon, David, and Wayne D. Kaplan. 2008. "Microanalysis in Electron Microscopy." Pp. 333–90 in *Microstructural characterization of materials*. John Wiley & Sons, LTD.

- Brundle, C. Richard, Charles A. Jr. Evans, and Shaun Wilson. 1992. *Encyclopedia of Materials Characterization*. edited by C. Richard Brundle, Charles A. Jr. Evans, and Shaun Wilson. Manning.
- Brunow, G., and K. Lundquist. 2010. "Functional Groups and Bonding Patterns in Lignin." in *Lignin and Lignans: Advances in chemistry*, edited by Cyril Heitner, Donal R. Dimmel, and John A. Schmidt. CRC Press.
- Campbell, Neil A., and Jane B. Reece. 2005. *Biología*. 7th ed. Madrid: Editorial Medica Panamericana.
- Chandrasekhar, S., P. N. Pramada, and L. Praveen. 2005. "Effect of Organic Acid Treatment on the Properties of Rice Husk Silica." *Journal of Materials Science* 40(24):6535–44. Retrieved June 12, 2011 (<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10853-005-1816-z>).
- Chandrasekhar, S., KG Satyanarayana, PN Pramada, P. Raghavan, and TN Gupta. 2003. "Review. Processing, Properties and Applications of Reactive Silica from Rice Husk — An Overview." *Journal of Materials Science* 38(15):3159–68. Retrieved December 13, 2011 (<http://doi.wiley.com/10.1002/chin.200406243>).
- Chen, Huilun et al. 2010. "Qualitative and Quantitative Analysis of Wood Samples by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis." *Carbohydrate Polymers* 82(3):772–78. Retrieved November 21, 2012 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861710004509>).
- CIAT. 2005. *Morfología de La Planta de Arroz: Guía de Estudio*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical. Retrieved September 3, 2012 ([http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=DTfQy22\\_\\_PcC&oi=fnd&pg=PA4&dq=Morfolog%C3%ADa+de+la+planta+de+arroz:+Gu%C3%ADa+de+estudio&ots=AQt4ZbCkcl&sig=2NQRpKhoujVv2TbBEbqXLWMPSSY](http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=DTfQy22__PcC&oi=fnd&pg=PA4&dq=Morfolog%C3%ADa+de+la+planta+de+arroz:+Gu%C3%ADa+de+estudio&ots=AQt4ZbCkcl&sig=2NQRpKhoujVv2TbBEbqXLWMPSSY)).
- Degiovanni, B., César Martínez, and Francisco Motta. 2010. *Producción Eco-Eficiente Del Arroz En América Latina*. Cali, Colombia: CIAT. Retrieved November 18, 2013 (<http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=vdw-JYBkra8C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Producci%C3%B3n+Eco-Eficiente+del+Arroz+en+Am%C3%A9rica+Latina&ots=zBaEw62e51&sig=0ZoLkoYgsDrpaOrXKQFcTnaPnpQ>).
- Dijk, Kitty Van. 1997. "RF Magnetron Sputter Deposition and Characterization of Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>OH Coatings." University of Nijmegen.
- Ebringerová, a, and Z. Hromádková. 2002. "Effect of Ultrasound on the Extractibility of Corn Bran Hemicelluloses." *Ultrasonics sonochemistry* 9(4):225–29. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12219586>).
- Epstein, Emanuel. 1999. "Silicon." *Annual review of plant biology* 50:641–64.

- Fang, J. M., R. C. Sun, and J. Tomkinson. 2000. "Isolation and Characterization of Hemicelluloses and Cellulose from Rye Straw by Alkaline Peroxide Extraction." *Cellulose* 7:87–107.
- Fang, Jiang-yu, and Xue-long Ma. 2006. "In Vitro Simulation Studies of Silica Deposition Induced by Lignin from Rice." *Journal of Zhejiang University. Science. B* 7(4):267–71. Retrieved June 12, 2011
- FAOSTAT. 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division.
- Forero, A, L A Medrano, and S Díaz. 2009. "Obtención de Silicio Metalúrgico a Partir de Mezclas de Ceniza de Cascarilla de Arroz Y Arena Silicea." *Suplemento de La Revista Latinoamericana de Metalurgia Y Materiales* 1 (3): 1349–52.
- Fountain, Michelle T., and Steve P. Hopkin. 2005. "Folsomia Candida (Collembola): A 'Standard' Soil Arthropod." *Annual review of entomology* 50:201–22.
- Gallego Picó, Alejandrina, Rosa María Garcinuño Martínez, and Mario José Morcillo Ortega. 2013. *Experimentación En Química Analítica*. Madrid: UNED. Retrieved May 28, 2014 ([http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=6xyP\\_oVTfoIC&oi=fnd&pg=PA9&dq=Experimentaci%C3%B3n+en+qu%C3%ADmica+anal%C3%ADtica&ots=yLTEIVVPsf&sig=SofdKjQnf3w7-KdGJHpcvBzNzcY](http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=6xyP_oVTfoIC&oi=fnd&pg=PA9&dq=Experimentaci%C3%B3n+en+qu%C3%ADmica+anal%C3%ADtica&ots=yLTEIVVPsf&sig=SofdKjQnf3w7-KdGJHpcvBzNzcY)).
- Gellerstedt, Göran. 2010. "Chemistry of Pulp Bleaching." in *Lignin and Lignans: Advances in chemistry*, edited by Cyril Heitner, Donal R. Dimmel, and John A. Schmidt. Boca Raton: CRC Press.
- Genieva, S. D., S. Ch. Turmanova, a. S. Dimitrova, and L. T. Vlaev. 2008. "Characterization of Rice Husks and the Products of Its Thermal Degradation in Air or Nitrogen Atmosphere." *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 93(2):387–96. Retrieved (<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10973-007-8429-5>).
- Georing, HK, and PJ Van Soest. 1970. "Forage Fiber Analysis." *Agriculture handbook*. Retrieved June 18, 2014 (<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Forage+Fiber+Analysis.#2>).
- Gil, Ángel. 2010. *Tratado de Nutrición: Composición Y Calidad Nutritiva de Los Alimentos*. 2a ed. Madrid, España: Editorial Panamericana. Retrieved September 4, 2012 (<http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=SQLNJOsZClwC&oi=fnd&pg=PR4&dq=Tratado+de+nutrici%C3%B3n&ots=W9FkL-Fc-N&sig=s6KUMuq2wMsFCxKjTalwP6bU7s4>).
- Giordano, R. et al. 2010. "Effect of a High Dose of Three Antibiotics on the Reproduction of a Parthenogenetic Strain of Folsomia Candida (Isotomidae: Collembola)." *Environmental entomology* 39(4):1170–77. Retrieved January 16, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22127168>).

- Gould, J. M. 1985a. "Enhanced Polysaccharide Recovery from Agricultural Residues and Perennial Grasses Treated with Alkaline Hydrogen Peroxide." *Biotechnology and bioengineering* 27(6):893–96. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18553753>).
- Gould, J. M. 1985b. "Studies on the Mechanism of Alkaline Peroxide Delignification of Agricultural Residues." *Biotechnology and bioengineering* 27(3):225–31. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18553662>).
- Heitner, C., D. Dimmel, and J. Schmidt. 2010. *Lignin and Lignans: Advances in Chemistry*. Retrieved November 18, 2013 (<http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=E74LS-rm6t8C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Lignin+and+lignans:+advances+in+chemistry&ots=Cy1DkLT2xz&sig=iHYdZygIYU9PFYt0FkmeWdkYcDY>).
- Hopkin, SP. 1997. *Biology of Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. Retrieved September 26, 2012 ([http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=F\\_Eo6r5xAzEC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Biology+of+Springtails+\(Insecta:+Collembola\)&ots=hWbTghrhyf&sig=6xlwapQL-EMttNPRBsKjX9UTP3I](http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=F_Eo6r5xAzEC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Biology+of+Springtails+(Insecta:+Collembola)&ots=hWbTghrhyf&sig=6xlwapQL-EMttNPRBsKjX9UTP3I)).
- Hopkin, Steve P. 2002. "Collembola." Pp. 207–10 in *Encyclopedia of Soil Science*, edited by Rattan Lal. Marcel Dekker.
- Irfan, M., Riaz M., Saleem Arif, M., Shahzad M., Saleem, F., Naveed Ur -Rahman, Leon van den Berg, and Farhat Abbas. 2014. "Estimation and Characterization of Gaseous Pollutant Emissions from Agricultural Crop Residue Combustion in Industrial and Household Sectors of Pakistan." *Atmospheric Environment* 84. Elsevier Ltd: 189–97. doi:10.1016/j.atmosenv.2013.11.046.
- ITS. n.d. "Integrated Taxonomic Information System (ITIS)." Retrieved March 20, 2013 (<http://www.itis.gov>).
- Kalia, Susheel, B. S. Kaith, and I. Kaur. Inderjeet Kaur. 2011. *Cellulose Fibers: Bio- and Nano-Polymer Composites*. Springer.
- Ke, Xin, and Stefan Scheu. 2008. "Earthworms, Collembola and Residue Management Change Wheat (*Triticum Aestivum*) and Herbivore Pest Performance (*Aphidina: Rhopalosiphum Padi*)." *Oecologia* 157(4):603–17. Retrieved May 14, 2011 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18654802>).
- Kerley, MS, GC Fahey, LL Berger, and NR Merchen. 1987. "Effects of Treating Wheat Straw with pH-Regulated Solutions of Alkaline Hydrogen Peroxide on Nutrient Digestion by Sheep." *Journal of Dairy Science* 2078–84. Retrieved December 8, 2011 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030287802564>).
- Kreuzer, K., M. Bonkowski, R. Langel, and S. Scheu. 2004. "Decomposer Animals (Lumbricidae, Collembola) and Organic Matter Distribution Affect the Performance of (Poaceae) and (Fabaceae)." *Soil Biology and Biochemistry* 36(12):2005–11. Retrieved June 12, 2011 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071704002482>).



- Krogh, P. H. et al. 2009. *Toxicity Testing with the Collembolans Folsomia Fimetaria and Folsomia Candida and the Results of a Ringtest*. Danish Environmental Protection Agency. Retrieved (<http://books.google.com.mx/books?id=5HtftwAACAAJ>).
- Labbé, Nicole, Timothy G. Rials, and Stephen S. Kelley. 2006. "FTIR Imaging of Wood and Wood Composites." in *Characterization of the Cellulosic Cell Wall*, edited by Douglas D. Stokke and Leslie H. Groom. Ames: Blackwell Publishing Ltd.
- Labrador, J. 2001. *La Materia Orgánica En Los Agrosistemas*. España: Grupo Mundi-Prensa. Retrieved September 26, 2012 (<http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGRINPA.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mn=011619>).
- Lampe, Klaus, Eckart Witzigmann, Tony Khoo, and Christian Teubner. 2001. *El Gran Libro Del Arroz*. Everest.
- Larkin, P. 2011. *Infrared and Raman Spectroscopy; Principles and Spectral*. Waltham, USA: Elsevier.
- Leary, Gordon J., and John A. Schmidt. 2010. "The Chemistry of Lignin-Retaining Bleaching: Oxidative Bleaching Agents." in *Lignin and Lignans: Advances in chemistry*, edited by Cyril Heitner, Donal R. Dimmel, and John A. Schmidt. CRC Press.
- León, Jorge. 2000. *Botánica de Los Cultivos Tropicales*. 3rd ed. San José, Costa Rica: Editorial Agroamérica. Retrieved September 3, 2012 ([http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=bOMNAQAAIAAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=Bot%C3%A1nica+de+los+cultivos+tropicales&ots=\\_iRJMCMvER&sig=XBUOvf1jLr6kiEcNisid1oA0UP0](http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=bOMNAQAAIAAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=Bot%C3%A1nica+de+los+cultivos+tropicales&ots=_iRJMCMvER&sig=XBUOvf1jLr6kiEcNisid1oA0UP0)).
- Levingstone, Tanya J. 2008. "Optimisation of Plasma Sprayed Hydroxyapatite Coatings." Dublin City University.
- Lewis, N. G., and E. Yamamoto. 1990. "Lignin: Occurrence, Biogenesis and Biodegradation." *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 41:455–96. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11543592>).
- Liou, TH. 2004. "Preparation and Characterization of Nano-Structured Silica from Rice Husk." *Materials Science and Engineering: A* 364(1-2):313–23. Retrieved June 26, 2014 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921509303007512>).
- Nakamoto, Kazuo. 2009. "Theory of Normal Vibrations." Pp. 1–147 in *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds. Part A: Theory and applications in organic chemistry*. John Wiley & Sons, Inc.
- Pak, Nelly. 1997. "Análisis de Fibra Dietética." in *Produccion y manejo de datos de composicion quimica de alimentos en nutricion*, edited by Cecilio Moron, Isabel Zacarias, and Saturnino De Pablo. FAO. Direccion de Alimentacion y Nutricion.

- Pan, X., Dominique Lachenal, and Catherine Lapierre. 1994. "On the Behaviour of Spruce Thermomechanical Pulp Lignin during Hydrogen Peroxide Bleaching." *Holzforschung* 48(5):429–35. Retrieved April 1, 2014 (<http://www.degruyter.com/view/j/hfsg.1994.48.issue-5/hfsg.1994.48.5.429/hfsg.1994.48.5.429.xml>).
- Park, BD, SG Wi, KH Lee, and AP Singh. 2003. "Characterization of Anatomical Features and Silica Distribution in Rice Husk Using Microscopic and Micro-Analytical Techniques." *Biomass and ...* 25(3):319–27. Retrieved January 15, 2014 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096195340300014X>).
- Patel, M., a. Karera, and P. Prasanna. 1987. "Effect of Thermal and Chemical Treatments on Carbon and Silica Contents in Rice Husk." *Journal of Materials Science* 22(7):2457–64. Retrieved (<http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF01082130>).
- Peña, SV, and IM Rojas. 2006. *Tecnología de La Madera*. 3rd ed. Madrid, España: Grupo Mundi-Prensa. Retrieved November 18, 2013 (<http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=Jn-sFcOqCzwC&oi=fnd&pg=PA3&dq=Tecnolog%C3%ADa+de+la+madera&ots=NaWADfTcb1&sig=3DXmGOJgWOTzLNUb3fZEoXrdj8M>).
- Pérez, J., J. Muñoz-Dorado, T. de la Rubia, and J. Martínez. 2002. "Biodegradation and Biological Treatments of Cellulose, Hemicellulose and Lignin: An Overview." *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 5(2):53–63. Retrieved June 12, 2011 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12180781>).
- Radea, C. 2000. "Cellulose Decomposition Rates and Soil Arthropod Community in a Pinus Halepensis Mill. Forest of Greece after a Wildfire." *European Journal of Soil Biology* 36(1):57–64. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1164556300010451>).
- Rahman, Ismail Ab, and Vejayakumaran Padavettan. 2012. "Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: Size-Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites—A Review." *Journal of Nanomaterials* 2012:1–15. Retrieved May 23, 2014 (<http://www.hindawi.com/journals/jnm/2012/132424/>).
- Ramírez González, A. 1999. *Ecología Aplicada: Diseño Y Análisis Estadístico*. Universidad de Bogotá.
- Rodrigues, Fabrício a, and Lawrence E. Datnoff. 2005. "Silicon and Rice Disease Management." *Fitopatologia Brasileira* 30(5):457–69. Retrieved ([http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-41582005000500001&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582005000500001&lng=en&nrm=iso&tlng=en)).
- Rusek, Josef. 1998. "Biodiversity of Collembola and Their Functional Role in the Ecosystem." *Europe* 1219:1207–19.
- Salanti, Anika, Luca Zoia, Marco Orlandi, Fabiana Zanini, and Graziano Elegir. 2010. "Structural Characterization and Antioxidant Activity Evaluation of Lignins from Rice Husk." *Journal of agricultural and food chemistry* 58(18):10049–55. Retrieved July 30, 2012 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20735133>).

- Sandler, RV, LB Falco, and C. Di Ciocco. 2010. "Eficiencia Del Embudo Berlese-Tullgren Para Extracción de Artrópodos Edáficos En Suelos Argiudoles Típicos de La Provincia de Buenos Aires." ... *del suelo* 28(1):1–7. Retrieved November 17, 2013 ([http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1850-20672010000100001](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1850-20672010000100001)).
- Scheller, Henrik Vibe, and Peter Ulvskov. 2010. "Hemicelluloses." *Annual review of plant biology* 61:263–89. Retrieved November 7, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20192742>).
- Segura, Freimar, and Rosario Echeverri. 2009. "Descripción Y Discusión Acerca de Los Métodos de Análisis de Fibra Y Del Valor Nutricional de Forrajes Y Alimentos Para Animales." *Vitae* 72–81. Retrieved June 19, 2014 (<http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/viewArticle/596>).
- Skoog, DA, DM West, and FJ Holler. 1997. *Fundamentos de Química Analítica*. Retrieved May 11, 2014
- Chungsangunsit, Thipwimon, Shabbir H Gheewala, and Suthum Patumsawad. 2009. "Emission Assessment of Rice Husk Combustion for Power Production." *World Academy of Science, Engineering and Technology* 3 (5): 185–90.
- Van Soest, P. J. 2006. "Rice Straw, the Role of Silica and Treatments to Improve Quality." *Animal Feed Science and Technology* 130(3-4):137–71. Retrieved June 12, 2011 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840106000502>).
- Van Soest, PJ, and JB Robertson. 1991. "Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition." *Journal of dairy science* 74:3583–97. Retrieved January 27, 2012 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030291785512>).
- Sugden, A. 1985. *Diccionario Ilustrado de La Botánica*. Tercera ed. España: Editorial Everest, S. A. Retrieved September 3, 2012 (<http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=LIBRO.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mf=004404>).
- Sun, R. 2000a. "Characterization of Lignins from Wheat Straw by Alkaline Peroxide Treatment." *Polymer Degradation and Stability* 67(1):101–9. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391099000993>).
- Sun, R. 2000b. "Comparative Study of Hemicelluloses from Rice Straw by Alkali and Hydrogen Peroxide Treatments." *Carbohydrate Polymers* 42(2):111–22. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861799001368>).
- Sun, Run-Cang. 2010. "Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels Chemistry." *Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose*. Retrieved July 26, 2014 (<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Cereal+Straw+as+a+Resource+for+Sustainable+Biomaterials+and+Biofuels#2>).

- Sun, Runcang, J. Tomkinson, F. C. Mao, and X. F. Sun. 2001. "Physicochemical Characterization of Lignins from Rice Straw by Hydrogen Peroxide Treatment." *Journal of Applied Polymer Science* 79(4):719–32. Retrieved ([http://doi.wiley.com/10.1002/1097-4628\(20010124\)79:4<719::AID-APP170>3.0.CO;2-3](http://doi.wiley.com/10.1002/1097-4628(20010124)79:4<719::AID-APP170>3.0.CO;2-3)).
- Tabatabaei, S., a Shukohfar, R. Aghababazadeh, and a Mirhabibi. 2006. "Experimental Study of the Synthesis and Characterisation of Silica Nanoparticles via the Sol-Gel Method." *Journal of Physics: Conference Series* 26:371–74. Retrieved June 12, 2011 (<http://stacks.iop.org/1742-6596/26/i=1/a=090?key=crossref.97a8b732f57f1c61ed3b05561f2d36c6>).
- Taiz, Lincoln, and Eduardo Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. 3rd ed. Sunderland, USA: Sinauer Associates.
- Thimm, T., A. Hoffmann, H. Borkott, J. C. Munch, and C. C. Tebbe. 1998. "The Gut of the Soil Microarthropod *Folsomia Candida* (Collembola) Is a Frequently Changeable but Selective Habitat and a Vector for Microorganisms." *Applied and environmental microbiology* 64(7):2660–69.
- Udén, P., P. H. Robinson, and J. Wiseman. 2005. "Use of Detergent System Terminology and Criteria for Submission of Manuscripts on New, or Revised, Analytical Methods as Well as Descriptive Information on Feed Analysis And/or Variability." *Animal Feed Science and Technology* 118(3-4):181–86. Retrieved June 8, 2014 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840104002809>).
- Umeda, J., H. Imai, and K. Kondoh. 2009. "Polysaccharide Hydrolysis and Metallic Impurities Removal Behavior of Rice Husks in Citric Acid Leaching Treatment." *Transactions of JWRI* 38(2):13–18. Retrieved January 15, 2014 (<http://www.jwri.osaka-u.ac.jp/publication/trans-jwri/pdf/382-03.pdf>).
- Umeda, Junko, and Katsuyoshi Kondoh. 2008a. "High-Purity Amorphous Silica Originated in Rice Husks via Carboxylic Acid Leaching Process." *Journal of Materials Science* 43(22):7084–90. Retrieved June 12, 2011 (<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10853-008-3060-9>).
- Umeda, Junko, and Katsuyoshi Kondoh. 2008b. "Process Optimization to Prepare High-Purity Amorphous Silica from Rice Husks via Citric Acid Leaching Treatment." *Transactions of JWRI* 37(1).
- Umeda, Junko, and Katsuyoshi Kondoh. 2010. "High-Purification of Amorphous Silica Originated from Rice Husks by Combination of Polysaccharide Hydrolysis and Metallic Impurities Removal." *Industrial Crops and Products* 32(3):539–44. Retrieved June 30, 2011 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669010001809>).
- Uribe-Hernández, Raúl, Juárez-Méndez, Carlos H., Montes de Oca, Marco A., Palacios-Vargas, José G., Cutz-Pool, Leopoldo, & Mejía-Recarmier, Blanca E. .. 2010. "Colémbolos (Hexapoda) Como Bioindicadores de La Calidad de Suelos Contaminados Con Hidrocarburos En El Sureste de México." *Revista mexicana de ...* Retrieved July 16, 2014 ([http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-34532010000100020&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-34532010000100020&script=sci_arttext)).

- Valverde Valdés, Teresa, and Zenon Cano-Santana. 2005. *Ecología Y Medio Ambiente*. Pearson Educación. Retrieved October 18, 2014 (<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=60747&indexSearch=ID>).
- Vickerman, John c., and Ian S. Gilmore. 2009. *Surface Analysis – The Principal Techniques 2nd Edition*. Second. edited by I. S. Vickerman, J. c., & Gilmore. John Wiley & Sons, LTD.
- Voort, P., and KC Vrancken. 1995. *Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface*. Netherlands: Elsevier Science B.V. Retrieved September 25, 2012 ([http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=QL-hZejwyG8C&oi=fnd&pg=PP2&dq=Characterization+and+Chemical+Modification+of+the+Silica+Surface,+Volumen+93&ots=o-iEN-9dzY&sig=1tYPz\\_JERE\\_luhjNSVxr1AHA7Yw](http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=QL-hZejwyG8C&oi=fnd&pg=PP2&dq=Characterization+and+Chemical+Modification+of+the+Silica+Surface,+Volumen+93&ots=o-iEN-9dzY&sig=1tYPz_JERE_luhjNSVxr1AHA7Yw)).
- Yu, Jun, Jibin Zhang, Jin He, Ziduo Liu, and Ziniu Yu. 2009. "Combinations of Mild Physical or Chemical Pretreatment with Biological Pretreatment for Enzymatic Hydrolysis of Rice Hull." *Bioresource technology* 100(2):903–8. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18760920>).