



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE  
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
AMBIENTALES**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN ENERGÍAS RENOVABLES**

**“EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE BIOETANOL E10 A PARTIR DEL  
RASTROJO DE MAÍZ EN LA PROVINCIA DE IMBABURA”**

**Trabajo de grado para obtener el título de ingeniería en Energías Renovables**

**AUTORA:** Jessica Magdalena Pinchao Mueses

**Director:** Juan Carlos García Montoya PhD.

**IBARRA - ECUADOR**

**2023**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
FACULTAD INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES  
CARRERA DE INGENIERÍA EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES

UNIVERSIDAD ACREDITADA RESOLUCIÓN NRO. 001-071-CEA/RES.2013-11  
Baroa Ecuador

**SOLICITUD:** ENTREGA DOCUMENTO DIGITAL DE TRABAJO DE TITULACIÓN.

**FECHA:** Ibarra, 6 junio de 2023

**DIRIGIDO A:** MSc. Betty Chavez  
DIRECTORA BIBLIOTECA UTN  
bmchavez@utn.edu.ec

**SOLICITANTE:** Jessica Magdalena Pinchao Mueses

**FACULTAD:** FICAYA

**CARRERA:** INGENIERÍA ENERGÍAS RENOVABLES

**ASUNTO:** De la manera más comedida solicito se me CERTIFIQUE que ha sido entregado en formato digital del trabajo de titulación "EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE BIOETANOL E10 A PARTIR DEL RASTROJO DE MAÍZ EN LA PROVINCIA DE IMBABURA" de mi autoría a la Biblioteca Universitaria. Para tal efecto me permito adjuntar el documento digital antes citado.

Agradezco, su atención.

Firma: 

Srta. Jessica Pinchao  
jmpinchaom@utn.edu.ec  
CC: 100395529-9  
Telf: 0993983640

**MISIÓN INSTITUCIONAL:** Contribuir al desarrollo educativo, científico, tecnológico, socioeconómico y cultural de la región norte del país. Formar profesionales críticos, humanistas y éticos comprometidos con el cambio social.

# AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

## 1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información

DATOS DE CONTACTO		
CÉDULA DE IDENTIDAD	1003955299	
APELLIDOS Y NOMBRES	Pinchao Mueses Jessica Magdalena	
DIRECCIÓN:	Imbabura, Ibarra barrio Colinas del Sur, calle "5 de junio"	
EMAIL:	jessicapinchao44@gmail.com	
TELÉFONO FIJO MOVIL:	062542344	0993983640

DATOS DE LA OBRA		
TÍTULO:	"EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE BIOETANOL E10 A PARTIR DEL RASTROJO DE MAÍZ EN LA PROVINCIA DE IMBABURA"	
AUTORA:	Pinchao Mueses Jessica Magdalena	
FECHA:	5 de junio de 2023	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO	<input type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniera en Energías Renovables	
DIRECTOR:	PhD. Juan Carlos García	

## 2. CONSTANCIA

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autores terceros, por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, 5 de junio de 2023

### LA AUTORA:

(Firma).....

**Pinchao Mueses Jessica Magdalena**

**C.I.1003955299**

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN ENERGÍAS RENOVABLES**

Trabajo de titulación revisada por el Comité Asesor, previa a la obtención del Título de:

**“EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE BIOETANOL E10 A PARTIR DEL  
RASTROJO DE MAÍZ EN LA PROVINCIA DE IMBABURA”**

**INGENIERA EN ENERGÍAS RENOVABLES**

**APROBADA:**

PhD. Juan Carlos García

**DIRECTOR**

Msc. Santiago Zarate Baca

**ASESOR**



FIRMA



FIRMA

**IBARRA – ECUADOR**  
**2023**

## **Agradecimientos**

*A Dios, por darme la vida y a mi familia, la salud, fuerza y sabiduría para culminar esta etapa de mi vida.*

*A ti Nuestra Señora del Quinche, que siempre has estado en mis plegarias, por la fe que tengo hacia a ti por los milagros que has realizado y he conocido te doy gracias.*

*A la Universidad Técnica del Norte que se ha convertido como en un segundo hogar y que está a la disposición de los estudiantes para la formación personal e intelectual.*

*A mi director Juan Carlos García Montoya PhD., Msc. Santiago Zarate, por haberme brindado su tiempo, por ayudarme en cada duda y desconcierto, por las correcciones bien sugeridas la paciencia en la realización de este proyecto.*

*A los docentes quienes han conformado la Carrera de Energías Renovables, que con sus conocimientos que nos han brindado acerca de las nuevas energías que se pueden generar con los recursos que disponemos.*

*A los laboratorios de la carrera de Biotecnología de la Universidad Técnica del Norte quien apporto con sus instalaciones y materiales y el apoyo incondicional de los técnicos docentes en especial a Karina Obando.*

*A Cristian, Juan, Saúl estudiantes de biotecnología y a Santiago Chávez estudiante de agroindustrias que me supieron impartir sus conocimientos sin egoísmo alguno para el desarrollo de la tesis.*

**Jessica Magdalena Pinchao Mueses**

## **Dedicatoria**

*A mi padre a quien quiero mucho Miguel Pinchao quien, con su apoyo incondicional y sus palabras de aliento me han sabido guiar, gracias al esfuerzo de todos los días que él ha tenido que hacer, que hoy ha permitido concluir en esta etapa de mi vida.*

*A mi madre Nely Mueses quien, con su comprensión, tolerancia, rectitud, paciencia y la ayuda incondicional que me ha brindado en todos los momentos de mi vida y principalmente con el cuidado de mi hijo.*

*A mi hijo Anderson Cuasapaz que será un impulsador de todas las metas que se llevaran a cabo dentro de mi vida quien me ha dado la fuerzas para seguir adelante y nunca rendirme.*

*A mis hermanos, Edwin, Roberth y Ariel quienes me han sabido cuidarme y gracias por nunca dejarme sola, en toda mi vida y cuando más los he necesitado siempre han estado ahí para ayudarme.*

*A todos mis familiares, que siempre han están a mi lado, especialmente quienes conforman la familia Rosero a quienes admiro mucho a todos y siempre les deseo lo mejor, gracias por los momentos vividos y experiencias inolvidables.*

*A todos mis amigos por su apoyo y compañía que estuvieron en cada instante de mi carrera en especialmente Elsa Ramírez, Omar Quinteros y Beatriz Quinche a quienes aprecio, gracias por su apoyo incondicional.*

***Jessica Magdalena Pinchao Mueses***

## ÍNDICE DE CONTENIDO

Contenido	Páginas
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	VIII
ÍNDICE DE TABLA .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS .....	II
RESUMEN .....	III
ABSTRACT .....	IV
Capítulo I.....	1
Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Problema de Investigación .....	3
1.3 Justificación.....	3
1.4 Pregunta Directriz.....	4
1.5 Objetivos General.....	4
1.5.1. Objetivos Específicos .....	5
1.6 Hipótesis .....	5
Capítulo II.....	6
Revisión de Literatura .....	6
2.1 Biomasa .....	6
2.1.1 Pretratamiento de Muestras .....	7
2.1.2 Pretratamientos Físicos.....	7
2.1.3 Pretratamientos Biológicos.....	8
2.1.4 Pretratamientos Químicos .....	8
2.2 <i>Pleurotos ostreatus</i> .....	8
2.2.1 Medios de Cultivos de Hongos.....	8
2.2.2 Pasteurización del Sustrato con Vapor .....	9
2.2.3 Pasteurización del Sustrato por Sumersión en Agua .....	9
2.2.4 Inoculación de Micelio del Hongo en el Sustrato.....	9
2.2.5 Incubación del Micelio en el Sustrato .....	9



2.3 Hidrólisis .....	10
2.3.1 Hidrólisis Enzimática .....	10
2.3.2 Hidrólisis Acida.....	11
2.3.3 Ajuste del pH.....	11
2.4 Proceso de Fermentación.....	11
2.4.1 Acoplamiento del Fermentador .....	12
2.4.2 Activación de Levadura.....	12
2.4.3 Temperatura.....	12
2.4.4 Tiempo de Fermentación .....	12
2.4.5 Destilación .....	12
2.5 Bioetanol.....	13
2.5.1 Bioetanol como Biocombustible .....	13
2.5.2 Propiedades del Bioetanol .....	14
2.6 Consumo de Gasolina en Ecuador.....	14
2.6.1 Consumo de Gasolina en Imbabura por Año .....	15
2.6.2 Situación del Cultivo de Maíz en Imbabura .....	16
2.6.3 Evaluación del Rastrojo de Maíz.....	17
2.7 Marco Legal.....	18
2.7.1 La Constitución del Ecuador .....	18
2.7.2 Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburíferas.....	19
Capítulo III .....	20
Metodología.....	20
3.1 Descripción del Área de Estudio .....	20
3.1.1 Selección del Área de Estudio y Elaboración del Mapa.....	21
3.1.2 Recolección del Residuo .....	21
3.2 Flujo de Materiales para el Proceso de Obtención de Bioetanol.....	21
3.2.1 Tratamiento del Material Lignocelulósico .....	22
3.2.2 Pretratamiento Mecánico Para el Sustrato.....	22

3.2.3 Obtención del Micelio de Hongos .....	22
3.2.4 Preparación del Sustrato Previo a la Inoculación .....	23
3.2.5 Inoculación del Micelio en el Sustrato .....	23
3.2.6 Incubación del Micelio en el Sustrato .....	24
3.2.7 Secado del Sustrato Colonizado .....	24
3.2.8 Hidrólisis Ácida.....	25
3.2.9 Regulación del pH .....	25
3.2.10 Activación de la Levadura.....	25
3.2.11 Fermentación .....	25
3.2.12 Destilación .....	26
3.3 Materia Prima con Potencial para la Producción de Bioetanol en la Provincia de Imbabura.....	26
3.3.1 Rendimientos de Etanol.....	27
3.3.2 Evaluación del Bioetanol con Respecto a los Sitios.....	27
3.4 Análisis del Aporte de Bioetanol E10 en Imbabura .....	27
Capítulo IV .....	29
Resultados y Discusión.....	29
4.1 Distribución Aleatoria del Maíz .....	29
4.2 Réplicas de Hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> en PDA .....	30
4.3 Estandarización del Sustrato previo a la Inoculación.....	30
4.4 Incubación del Micelio .....	31
4.5 Secado del Sustrato Colonizado .....	32
4.6. Evaluación de Hidrólisis Ácida.....	33
4.7 Rendimiento de Etanol .....	34
4.9 Extrapolación del Bioetanol para una Tonelada.....	35
4.10 Ahorro de combustible en la provincia de Imbabura .....	36
4.11 Aporte Económico al País .....	36
Capítulo V .....	38

Conclusiones y Recomendaciones .....	38
5.1 Conclusiones.....	38
5.2 Recomendaciones .....	38
Referencias .....	40
ANEXO A .....	49
ANEXO B .....	50
ANEXO C .....	57
ANEXO D .....	58
ANEXO E.....	61
ANEXO F.....	63

## ÍNDICE DE TABLA

<b>Tabla 1</b> Principales Cultivos en la Provincia de Imbabura .....	2
<b>Tabla 2</b> <i>Clasificación y Composición de Diferentes Materiales Lignocelulósicos</i> .....	7
<b>Tabla 3</b> <i>Porcentaje de Biopolímeros en el Sustrato Antes y Después de FES con P. ostreatus</i> .....	10
<b>Tabla 4</b> <i>Evaluación de Jarabes Glucosados por Hidrólisis Ácida en Diferentes Materiales</i>	11
<b>Tabla 5</b> <i>Clasificación de la Producción de Biocombustibles y Principales Materias Primas</i>	13
<b>Tabla 6</b> <i>Propiedades Físico-Químicas del Etanol</i> .....	14
<b>Tabla 7</b> <i>Producción e Importación y Consumo Nacional de Gasolinas</i> .....	15
<b>Tabla 8</b> <i>Análisis del Consumo de Gasolina en la Provincia de Imbabura por Año</i> .....	16
<b>Tabla 9</b> <i>Superficie Plantada en la Provincia de Imbabura</i> .....	16
<b>Tabla 10</b> <i>Características a Evaluar de los Residuos de Maíz</i> .....	17
<b>Tabla 11</b> <i>Características de las Parroquias donde se Realizó el Muestreo</i> .....	18
<b>Tabla 12</b> <i>Recolección del Residuo de Maíz en Imbabura</i> .....	21
<b>Tabla 13</b> <i>Perspectiva de la Producción Agrícola</i> .....	27
<b>Tabla 14</b> <i>Estandarización del Pretratamiento del Sustrato</i> .....	30
<b>Tabla 15</b> <i>Contenido de humedad de los sustratos</i> .....	33
<b>Tabla 16</b> <i>Contenido de Glucosa en las Muestras de Hidrólisis Ácida</i> .....	34
<b>Tabla 17</b> <i>Obtención de Bioetanol con Rastrojo de Maíz</i> .....	34
<b>Tabla 18</b> <i>Perspectiva de Bioetanol que se Genera Anualmente</i> .....	35
<b>Tabla 19</b> <i>Consumo de Gasolina y Extrapolación de Bioetanol Anualmente Generado</i> .....	36
<b>Tabla 20</b> <i>Ahorro Económico</i> .....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> <i>Producción de Bioetanol</i> .....	1
<b>Figura 2</b> <i>Estructura de la Biomasa Lignocelulósica</i> .....	6
<b>Figura 3</b> <i>Participación de los Sectores en el Consumo de Gasolinas 100%</i> .....	14
<b>Figura 4</b> <i>Distribución Espacial del Cultivo de Maíz en Imbabura</i> .....	20
<b>Figura 5</b> <i>Flujograma del Proceso de Obtención de Bioetanol</i> .....	22
<b>Figura 6</b> <i>Inoculación con Micelio Técnica (a) y (b) en Sustrato de Maíz</i> .....	24
<b>Figura 7</b> <i>Destilación de Bioetanolioetanol</i> .....	26
<b>Figura 8</b> <i>Mapa del Área de Estudio</i> .....	29
<b>Figura 9</b> <i>Colonización del Hongo en PDA</i> .....	30
<b>Figura 10</b> <i>Técnica (a) Tiempo de Colonización en el Sustrato</i> .....	31
<b>Figura 11</b> <i>Técnica (b) Tiempo de Colonización en el Sustrato</i> .....	32
<b>Figura 12</b> <i>Tiempo de Secado del Material Delignificado</i> .....	32

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y**  
**AMBIENTALES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN ENERGÍAS RENOVABLES**

**EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE BIOETANOL E10 A PARTIR DEL**  
**RASTROJO DE MAÍZ EN LA PROVINCIA DE IMBABURA**

Jessica Magdalena Pinchao Mueses

**RESUMEN**

El agotamiento y el aumento del precio de petróleo ha generado incertidumbre en los gobiernos, dependerá de estos para promover las fuentes alternativas de energías renovables para suplir la demanda energética. Es así que la búsqueda de nuevas alternativas de biocombustibles a partir de los recursos sostenibles como son los residuos agrícolas que no afectarán la seguridad alimentaria. El rastrojo de maíz son residuos del cual se puede obtener bioetanol de segunda generación. El objetivo de este estudio es definir y estandarizar los parámetros adecuados para la obtención de bioetanol en condiciones de laboratorio, en los procesos de delignificación e hidrólisis ácida y la regulación del pH. Las condiciones en el proceso de delignificación se utilizó la técnica tresbolillo para la siembra, en la concentración de ácido sulfúrico al 1%, con un tiempo de 30 minutos, fueron los más óptimos para la obtención de jarabes glucosados, todo este proceso se realizó a una temperatura de 121°C y a una presión de 15 psi para los diferentes rastrojos de maíz de 3 sitios en Imbabura. La fermentación se realizó con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que trabajó con diferentes pH 3, 4 y 5 a una temperatura 30°C y a 200 rpm en un periodo de 8 días en total oscuridad. La destilación del bioetanol se realizó a una temperatura de 78°C obteniendo mejores rendimientos de bioetanol con relación al pH 5 y con el rastrojo de maíz de San Roque 0.17 ml/g.

**Palabras clave:** Biomasa agro residual, Bioetanol, Delignificación biológica, Hidrólisis Ácida, Fermentación.

# “EVALUATION OF THE YIELD OF BIOETHANOL E10 FROM CORN STUBBLE IN THE PROVINCE OF IMBABURA”

Jessica Magdalena Pinchao Mueses

## ABSTRACT

Oil depletion and the price increase has generated uncertainty in governments to meet energy demand. Thus, the search for new energy alternatives is the challenge, depending on available resources. One form of energy generation is from agricultural waste; such as corn stover from which a second-generation biofuel can be obtained. For this purpose, the appropriate parameters to generate bioethanol under laboratory conditions were critical, then the delignification process with two techniques sowed and acid hydrolysis were evaluated by the DNS method from which the best treatment was determined to get glucose syrups, being this the concentration of sulfuric acid at 1%, with a time of 30 minutes, these being the most optimal for obtaining glucose. For the fermentation process, the yeast of *Saccharomyces cerevisiae* was carried out, which worked by different pHs such as 3, 4 and 5 at a temperature of 30°C and 200 rpm in a period of 8 days in total darkness. The bioethanol distillation process was conducted at a temperature of 78°C obtaining better bioethanol yields in relation to pH when it was 5, presenting the maximum production where San Roque's corn stover was 0.17 ml/g.

**Keywords:** Agroresidual biomass, Bioethanol, Biological delignification, Fermentation.

# Capítulo I

## Introducción

En este capítulo se explica la problemática que existe en la producción de bioetanol de primera y segunda generación, y las nuevas alternativas para generar energía a partir de residuos agrarios, considerando a la provincia de Imbabura como un lugar con una producción agraria significativa, generando expectativas en el potencial energético que esto conlleva.

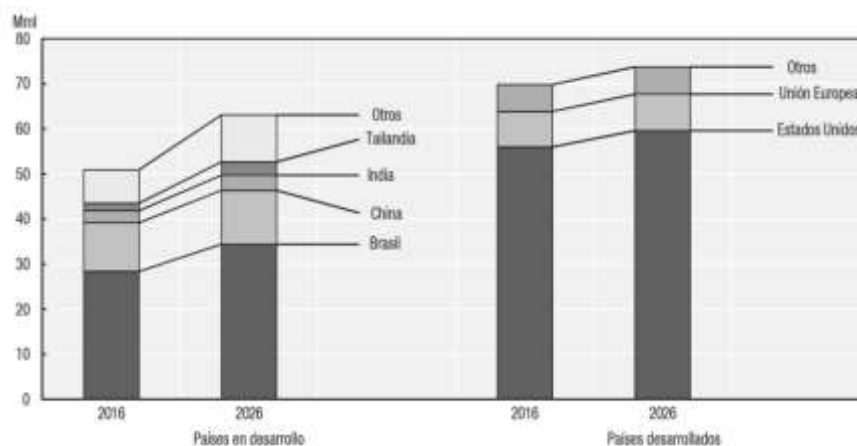
### 1.1 Antecedentes

La disminución de las fuentes de petróleo ha generado una preocupación por la seguridad energética, es así que se están buscando nuevas alternativas de energías renovables como el uso de la biomasa agrícola para la producción de biocombustibles (Romero et al., 2019). En este contexto, se puede considerar que los materiales lignocelulósicos podrían ser una fuente de energía con potencial para la producción de biocombustible que gradualmente podrían reemplazar a los combustibles fósiles (Jimenez, 2018).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2018) mencionó que alrededor del 5% de combustible utilizado en el transporte proviene de los biocombustibles. A nivel mundial los países productores como Brasil a partir de la caña de azúcar y Estados Unidos con el maíz generan significativas cantidades de bioetanol, como indica la Figura 1 realizado por la FAO y Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE-FAO, 2017).

**Figura 1**

*Producción de Bioetanol*



*Nota.* Proyección de bioetanol para el año 2026. Adaptado de Biocombustibles situación del mercado aspectos relevantes de la proyección, OCDE-FAO. (2017)., <http://www.fao.org/3/a-BT092s.pdf>.



El efecto de la producción de bioetanol con productos de primera generación causó el aumento en los precios de los alimentos y sigue siendo objeto de un intenso debate la producción para alimentación o biocombustibles (Brinkman et al., 2020). Es por esta razón que el uso de tierras agrícolas son reemplazadas con plantaciones energéticas, esto también ha provocado el aumento de la deforestación y reducción de la biodiversidad (Tudge et al., 2021). En lo que se refiere a los biocombustibles de segunda generación, es decir de la biomasa residual no compiten con los recursos alimentarios, para la producción de estos (Kim et al., 2018). La utilización de un biocombustible tiene muchas ventajas ambientales, mejor combustión en automóviles, reduce las emisiones de CO<sub>2</sub> (Matsuda & Takeuchi, 2018). Es importante mencionar que en motores de combustión interna el E10, no necesita ninguna modificación que pueda afectar el rendimiento y funcionamiento de los automóviles (Brinkman et al., 2020).

La biomasa lignocelulosa surge como una alternativa para la producción de bioetanol a partir de los residuos forestales y agrícolas como son: el bagazo de caña de azúcar, olote, paja de trigo, arroz y rastrojo de maíz (Devi et al., 2022). Además, en el caso de la sierra ecuatoriana la producción de maíz (*Zea Mays L*) es abundante debido a la superficie sembrada y al papel que cumple en la seguridad y soberanía alimentaria, sin embargo, el aprovechamiento del rastrojo de maíz no ha tenido el destino de convertirse en un biocombustible de acuerdo con el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2017). Se hace necesario resaltar que la provincia de Imbabura se ha destacado por diferentes cultivos, así como la producción de maíz con 6 627 toneladas de grano con una superficie de 5 489 hectáreas como muestra la Tabla 1 como lo indica Sistema de Información Pública Agropecuaria del Ecuador (SIPA, 2021).

**Tabla 1**

*Principales Cultivos en la Provincia de Imbabura*

Productos	Superficie Planta (ha)	Superficie Cosechada(ha)	Producción (toneladas )	Rendimiento (t/ha)
Maíz suave seco	3 968	3 834	2 890	0.75
Plátano	2 810	2 030	13 798	6.80
Caña de azúcar	2 562	2 462	333 755	135.55
Fréjol seco	1 846	1 800	887	0.49
Maíz suave choclo	1 521	1 467	3 737	2.55

Los residuos generados con la producción de maíz están destinados principalmente para alimento del ganado bovino (Caballero et al., 2017). Debido a esto, la alimentación con este residuo en esta especie, ha generado mayores emisiones de metano CH<sub>4</sub> y esto ha permitido contribuir al incremento del calentamiento global (Luna & Fachin, 2014). Mientras que otros agricultores para deshacerse de estos residuos, optan por la práctica de la quema a campo abierto, aportando grandes cantidades de CO, CO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, actividad que afecta a la calidad del aire y a la salud humana (Chantara et al., 2019).

## **1.2 Problema de Investigación**

El uso indiscriminado de los combustibles fósiles da a lugar a buscar nuevas fuentes de energías, sobre todo porque es una energía convencional de origen fósil que en un lapso de tiempo se irán agotando gradualmente, debido al consumo excesivo de esta forma de energía en el sector transporte. Además, esto ha impulsado al desarrollo de los biocombustibles con la finalidad de reducir las emisiones de CO<sub>2</sub> en el ambiente.

La obtención de bioetanol para el sector transporte en la actualidad se está realizando con productos de primera generación, a partir de la caña de azúcar y grano de maíz. Esto ha provocado el desvío de los recursos alimenticios hacia la producción de biocombustibles. Evidentemente una alternativa que se plantea es la producción de bioetanol de segunda generación, con residuos agrícolas y forestales, compuestos principalmente por celulosa, estos pueden ser el bagazo de la caña de azúcar, el rastrojo de maíz, paja de trigo, aserrín, hojas y ramas secas para este fin. De esta manera, no involucra a la cadena alimentaria, y además se da un valor agregado a este subproducto.

La provincia de Imbabura cuenta con una superficie de 5 489 hectáreas destinada para estos cultivos (SIPA, 2021) generando grandes cantidades de residuos como es el rastrojo de maíz, a la vez esto, se utiliza como una fuente de energía, donde se transforma en un biocombustible, a través de pretratamientos físico, químicos y biológicos. Probablemente la abundancia de este recurso podría suplir parte de la demanda de gasolina en la provincia de Imbabura y de esta manera aportara al cambio de la matriz energética.

## **1.3 Justificación**

Ante la disminución de fuentes de petróleo y el aumento de los precios, se necesita buscar nuevas fuentes para generar energía limpia y amigable con el ambiente. Es posible que, el potencial de residuos forestales y agrícolas que se generan anualmente, y que, tratados de

manera óptima, cubrirían la demanda de bioetanol. Por lo contrario, este material esta predeterminado a terminar en vertederos, o incinerados al aire libre la segunda actividad tiene una consecuencia afecta al medio ambiente con las emisiones emitidas en el proceso.

En el Ecuador se comenzó implementado la utilización del bioetanol a través del plan piloto de la gasolina Ecopaís E5 en la provincia del Guayas y que se ha seguido extendiendo a diferentes provincias como Esmeraldas, Azuay, Cañar, Morona Santiago, Zamora Chinchipe, Loja, Manabí, Santa Elena y El Oro con una aceptación del producto. Sin embargo, se conoce que la materia prima que se utiliza para elaborar esta gasolina es a partir de la caña de azúcar.

El resto del Ecuador carece de este programa lo cual hace pensar que no existe el recurso necesario para abastecer a toda la demanda del país. Por lo tanto, para cumplir con la demanda es necesario utilizar otras fuentes y recursos como es la biomasa residual distribuida a lo largo del territorio, con el fin de optimizar los recursos. Es así que la producción de bioetanol permitirá reducir las importaciones de combustibles, abaratará la factura nacional de gastos en concepto de energía importada y diversificará la matriz energética.

El Ecuador es un país agrícola con un alto potencial de residuos agrarios, en este caso el rastrojo de maíz podría ser utilizado como materia prima para la obtención de bioetanol de segunda generación. La intención es presentar una alternativa de energía para el sector transporte, que podría ser un biocombustible que se genera a partir de materiales lignocelulósicos.

La provincia de Imbabura se ha destacado por la producción de maíz, en donde el subproducto de esta actividad es utilizado para la alimentación del ganado bovino. Sin embargo, darle un valor agregado a este residuo como ingreso extra para el agricultor podría ser clave en la erradicación de la pobreza en el agro. Es así que el uso de los residuos agrícolas con fines energéticos como es la producción de bioetanol, permitiría generar nuevas fuentes de trabajo y recursos económicos.

#### **1.4 Pregunta Directriz**

¿Es posible obtener un rendimiento óptimo de bioetanol a partir de rastrojo de maíz?

#### **1.5 Objetivos General**

Evaluar el rendimiento de bioetanol E10 a partir del rastrojo de maíz en la provincia de Imbabura.

### ***1.5.1. Objetivos Específicos***

- Determinar los parámetros adecuados para el proceso de obtención de bioetanol en condiciones de laboratorio.
- Analizar el rendimiento de bioetanol con rastrojo de maíz en diferentes zonas de recolección en la provincia de Imbabura.
- Estimar la aportación de bioetanol E10 en función de la demanda de gasolina en la provincia de Imbabura.

### **1.6 Hipótesis**

Ho: El rendimiento de bioetanol con el rastrojo de maíz es igual para cada zona de estudio.

Ha: El rendimiento de bioetanol con el rastrojo de maíz es diferente para cada zona de estudio.

## Capítulo II

### Revisión de Literatura

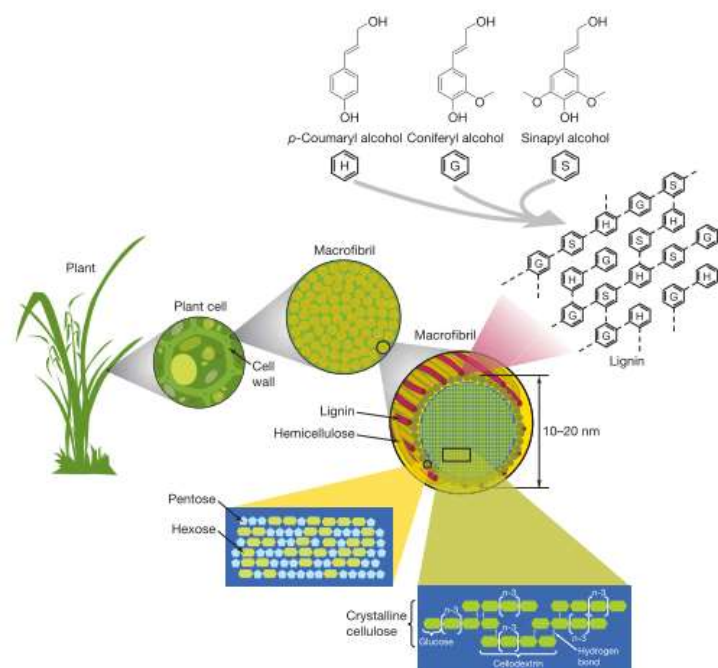
En el presente capítulo se da a conocer la revisión de literatura de residuos lignocelulósicos para la obtención de bioetanol de segunda generación, las características de los sitios donde se encuentra la materia prima y la demanda de gasolina en Imbabura.

#### 2.1 Biomasa

La biomasa está conformada por tres componentes: celulosa, hemicelulosa y lignina este último hace que la producción de bioetanol sea compleja (Rogel & Ayala, 2017). Otro componente es la hemicelulosa está estructurada por homo y heteroglucano formado por pentosas y hexosas que son (xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, glucosa y ácido glucurónico) y finalmente la celulosa  $(C_6H_{10}O_5)_n$  es el polisacárido más abundante en la naturaleza compuesto de moléculas de  $\beta$ - glucosa como muestra la Figura 2 (Peña et al., 2016). La composición de los materiales lignocelulósicos varía de acuerdo a la especie, la altitud, edad, clima, temperatura, nutrientes del suelo, ubicación geográfica por tal motivo presentan variación en la composición (Arellano & Houbrom, 2015).

#### Figura 2

##### *Estructura de la Biomasa Lignocelulósica*



Nota. Composición de los residuos Adaptado de *Genomics of cellulosic biofuels*. Rubin, E. (2008), <https://doi.org/10.1038/nature07190>

Los materiales lignocelulósicos son muy diferentes, presentan proporciones con una relación aproximadamente de celulosa del 20% al 50%, hemicelulosa del 10% al 30%, y lignina, del 10% al 30% (Morales & Campos, 2015). Según (Aurora & Vázquez, 2017) demuestran que la composición del rastrojo de maíz es de 36.8% celulosa, 30.6 % hemicelulosa, 23.1% lignina y cenizas y extractivos 9.5 % como se presenta en la siguiente Tabla 2.

**Tabla 2**

*Clasificación y Composición de Diferentes Materiales Lignocelulósicos*

Biomasa	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Cenizas y Extractivos (%)
Álamo	49.9	25.1	18.1	6.9
Arce	44.9	23.0	28.0	4.1
Chopo	43.5	21.8	26.2	8.5
Nogal	46.2	20.9	21.9	11
Pino	46.4	20.6	29.4	3.6
Abeto	49.9	21.6	28.7	0.2
Paja de cebada	33.1	24.9	16.1	25.9
Residuos de maíz	36.8	30.6	23.1	9.5
Paja de Trigo	30.2	22.3	17.0	30.5
Pasto varilla	45.0	31.4	12.0	11.6
Papel periódico	40-55	25-40	18-30	17-25

*Nota.* Esta tabla indica la composición de celulosa, hemicelulosa y lignina permitiendo conocer según el tipo de material a trabajar (Aurora & Vázquez, 2017).

**2.1.1 Pretratamiento de Muestras**

Los pretratamientos disponibles para abrir la estructura y eliminar la lignina para la obtención de bioetanol con residuos lignocelulósica son de naturaleza física, biológica y química (Rezania et al., 2020). También, estos permiten ser más accesibles a la celulosa en los residuos agrarios, el objetivo que presenta es aumentar la porosidad en las muestras (Naresh et al., 2019).

**2.1.2 Pretratamientos Físicos**

El material lignocelulósico se procede a una trituración de 2 mm, de igual forma se tiene que trabajar a temperaturas altas, alrededor de 300°C (Rezania et al., 2020). Es decir, la temperatura de trabajo mínima es de 130°C, mediante la inyección directa de vapor saturado, durante un tiempo de tres minutos (Cruz et al., 2019).

### **2.1.3 Pretratamientos Biológicos**

Los microorganismos biológicos son capaces de degradar la lignina entre los que se destacan los hongos blancos, cambiando la estructura fisicoquímica de la biomasa lignocelulósica estos pretratamientos son muy atractivos desde el punto de vista económico, tienen un gasto energético y de inversión menor que otros (Cheah et al., 2020). De la misma forma los hongos degradan la lignina y la hemicelulosa, eliminando las barreras que protegen la celulosa en donde se ha destacado *Pleurotus ostreatus* hay que destacar que el crecimiento adecuado se realizara en un ambiente relativamente húmedo en un 60 a 90 % (Gonzales & Sierra, 2018).

### **2.1.4 Pretratamientos Químicos**

La hidrólisis ácida es aplicada para disolver la fracción hemicelulósica de la biomasa para así hacer más accesible a la celulosa, para ello se utiliza ácidos concentrados o diluidos, como el ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), clorhídrico (HCl) en unas concentraciones de 1 al 10% en tiempos de 3 minutos a temperaturas de 180 - 240 °C si se desea reducir la temperatura se utilizará una mayor concentración entre 20 – 40 % en tiempos de 15 a 30 minutos (Abo et al., 2019). Otro proceso consiste en sumergir el sustrato con  $H_2SO_4$  o HCl en diferentes concentraciones que van desde 0.5 a 8 % y en una relación de solido: liquido 1:10, en un tiempo de 1 - 4 horas y a una temperatura de 50-215 °C (Montiel & Romero, 2015).

## **2.2 *Pleurotus ostreatus***

*Pleurotus ostreatus* pertenece al reino fungí, al género *Pleurotus*, especie *ostreatus* es la segunda variedad más consumida en el mundo después del champiñón están distribuidos en todas partes, contribuyen a la degradación de los restos vegetales (Ramady et al., 2022). Estos organismos permiten la disminución del contenido de la lignina y la hemicelulosa sin afectar la celulosa, es por esta razón el sustrato utilizado después de una cosecha de esta especie queda reduciendo el contenido de lignina en un 4.8%, hemicelulosa en 14.66% y aumentando notablemente hasta en un 70.11% celulosa (Grover et al., 2015).

### **2.2.1 Medios de Cultivos de Hongos**

Los medios de cultivos son medios que presenta todos los nutrientes que favorece al crecimiento óptimo de los hongos, que se dará a conocer a continuación como es el PDA (Papa, Destroza, Agar) también tenemos el medio de cultivo Agar Extracto de Malta (Sardar et al.,

2015). Estos han sido utilizados para la preservación de especies, hay que especificar que se conservará en refrigeración a una temperatura de 4°C (Mulero et al., 2017).

### **2.2.2 Pasteurización del Sustrato con Vapor**

Este proceso se realiza principalmente para eliminar la presencia de microorganismos que podrían afectar en el proceso de delignificación. Previamente el sustrato tiene que ser humedecido hasta un 65% y empaquetado en bolsas plásticas que resistan temperaturas altas porque serán sometidas en un autoclave a 121°C y 15 psi durante una hora (Filippi et al., 2019). Otros Autores mencionan que el proceso consiste en colocar las muestras en un recipiente metálico, y aplicar vapor hasta temperaturas de 70-80 °C, aproximadamente un tiempo de 1 hora (Villar, 2021) .

### **2.2.3 Pasteurización del Sustrato por Sumersión en Agua**

El proceso se realiza durante una hora, primero se coloca en fundas con 2 kg de sustrato se sumergió en agua a una temperatura de 80°C con el objetivo de eliminar microorganismos en el sustrato, segundo se procede a escurrir el sustrato y finalmente se pesa y se coloca el 0.5% de cal agrícola y yeso por cada 100g de peso húmedo (Holgado et al., 2019). Otros autores ubican el sustrato en el recipiente metálico, se utiliza agua al ras, se calienta y se evita la ebullición a una temperatura de 80°C a 100°C durante dos horas, luego se procede a centrifugar el sustrato hasta tener una humedad adecuada para la siembra (Fernández et al., 2019).

### **2.2.4 Inoculación de Micelio del Hongo en el Sustrato**

Se procede a inocular 5% del micelio con la relación del peso del sustrato húmedo, mediante el método de siembra de tresbolillo esta técnica presenta un manejo sobre el área (Fajardo et al., 2022) y (Vargas & Lopez, 2019). Además, en la inoculación del sustrato se realiza después del proceso de pasteurización proceso que se trabaja a una temperatura de 22°C, conjuntamente se maneja un volumen de 3.18 kg, se colocó ¼ de sustrato y una capa de micelio intercalando (Donado, 2014).

### **2.2.5 Incubación del Micelio en el Sustrato**

El proceso de incubación del micelio de *Pleurotus ostreatus* se realiza a 26°C o también, puede variar de 25°C a 28°C (Angulo et al., 2022). Otros autores mencionan que el tratamiento



se mantendrá a una temperatura de 28°C aproximadamente y la colonización total del micelio se realiza en un periodo de 35 a 50 días (Díaz et al., 2019).

### 2.2.6 Degradación de Lignina

El estudio realizado dentro de la Universidad Técnica del Norte donde se trabajó con un mismo sustrato como es el maíz con el tema Evaluación de Pretratamiento Biológico en la Delignificación de Residuos de Maíz (*Zea Mays L*) con el uso de hongos *Pleurotus ostreatus* y *Lentinus edodes* en la provincia de Imbabura, demostrando que es conveniente utilizar esta especie *Pleurotus ostreatus* por que presenta mayor capacidad para degradar la lignina como muestra la Tabla 3 de García y Juma (2019).

**Tabla 3**

*Porcentaje de Biopolímeros en el Sustrato Antes y Después de FES con P. ostreatus*

Polímeros (%)	Contenido de Polímeros en el Sustrato de maíz											
	Seco 1			Choclo 1			Seco 2			Choclo 2		
	Sus	Enr	Sus+Po	Sus	Enr	Sus+Po	Sus	Enr	Sus+Po	Sus	Enr	Sus+Po
Lignina	14.7	11.1	9.7	16.4	14.9	14.5	17.5	18.7	12.1	17.1	8.5	10.5
Hemicelulosa	32.5	29.7	53.0	34.0	34.2	53.9	59.7	33.8	47.9	48.0	29.7	49.9
Celulosa	52.8	59.2	37.8	49.6	50.9	38.2	22.8	47.6	45.3	34.9	61.8	44.0

Sus= Sustrato de los diferentes tipos de maíz

Po= Sustrato inoculado con *P. ostreatus*

Enr = Sustratos enriquecido con suplementos nutritivos

FES= fermentación solida

*Nota.* Esta tabla fue obtenida de García y Juma (2019)

## 2.3 Hidrólisis

La hidrólisis es la transformación de celulosa a glucosa trabajando en temperaturas de 40 a 50 °C (Vasić et al., 2021). La finalidad es de convertir en azúcares simples, la intención del pretratamiento es reducir la cristalinidad de la celulosa, mediante el cual existen diferentes procesos como es la hidrolisis enzimática o química con similar propósito (Dos et al., 2019).

### 2.3.1 Hidrólisis Enzimática

El proceso es la transformación de celulosa a glucosa es realizado por enzimas que son extraídas de bacterias y hongos los más utilizados a nivel industrial *fusarium*, *trichoderma* y *phanerochaete* permitiendo la degradación de la celulosa (Ronquillo & Niño, 2018). De igual manera existen especies como *trichoderma viride* que producen enzimas que son utilizadas en el proceso de obtención de bioetanol, también hay enzimas comerciales como son Celluclast 1.5 L extraído de *trichoderma reesei*; Viscozyme complejo multienzimático derivado de *Aspergillus aculeatus* (Cruz et al., 2019).

### 2.3.2 Hidrólisis Ácida

Es el proceso donde se utiliza compuestos químicos como el ácido sulfúrico y clorhídrico para la obtención de jarabes glucosados (Arellano & Houbrom, 2015). En la realización y experimentación se evalúa la concentración de ácido sulfúrico, la temperatura que puede variar o ser constante lo decide el investigador y finalmente el tiempo como se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4**

*Evaluación de Jarabes Glucosados por Hidrólisis Ácida en Diferentes Materiales*

Material Utilizado	Concentración de ácido (%)	Tiempo (min)	Temperatura °C	Mediciones Optimas	Fuente
Bagazo de caña de azúcar	1,2, 4, 6	30, 60 y 90	160-180	1%, 30 (min) y 160°C	(Congsomjit & Areeprasert, 2021)
Yuca	2, 3 y 4	120, 180 y 240	121	2%,120 (min)	(Purata et al., 2018)
Nopal	1, 3 y 5	30 y 60	Ambiente	1%,60 (min)	(Jiménez et al., 2018)
Cáscaras de café	3,4 y 5	35, 45, 55	50	3%,55 (min) 50°C	(Morales et al., 2021)

El comportamiento de la celulosa está conformado por un conjunto de microfibrillas también están compuestas por cadenas poliméricas conformadas por varias unidades de glucosas unidas por un átomo de oxígeno. El ácido se adhiere a la celulosa y se produce una reacción entre un ion hidrogeno y un átomo de oxígeno desdoblado la cadena glucosídica y produciendo glucosa (Puccio & Simeoni, 2015).

### 2.3.3 Ajuste del pH

Este proceso se realiza con la finalidad de un buen desarrollo de la levadura en el proceso de fermentación donde se ajusta el pH a 3 a 5 con hidróxido de sodio (NaOH), cuando sea bajo, si es alto se utiliza la sustancia ácido clorhídrico (HCl) para reducir el pH (Trujillo et al., 2018). Otros autores indican que para regular el pH utilizaran hidróxido de sodio y ácido acético e para subir y bajar el nivel respectivamente (Vásquez, 2017).

## 2.4 Proceso de Fermentación

Este proceso es realizado por microorganismos aeróbico que trabaja en condiciones óptimas que se dará a conocer a continuación previo a la obtención de bioetanol.

#### **2.4.1 Acoplamiento del Fermentador**

Se utiliza botellas o frascos de vidrio o plásticos este material es el más práctico para construir un fermentador y de fácil acceso (Jimenez, 2018). Por otra parte, la desgasificación uno de los productos en la reacción de fermentación es el CO<sub>2</sub> para lo cual se coloca una manguera en la parte superior del fermentador, el subproducto emitido durante el proceso es depositado en un recipiente con agua (Montiel y Romero, 2015). Este medio es utilizado para permitir la salida de gases e impedir la entrada del aire (Jimenez, 2018).

#### **2.4.2 Activación de Levadura**

La levadura liofilizada (marca Flema), se usa según las especificaciones que son colocar 20 ml de agua hervida tibia, adicionamos y diluimos 0.4g de levadura y 3g de azúcar se la deja reposar 15 minutos (Virreira et al., 2014). Otros autores mencionan la preparación del inóculo se realiza en 75ml de agua tibia y 35g de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y se deja reposar durante 15 minutos a una temperatura de 30 a 35 °C (Valdés & Morales, 2017).

#### **2.4.3 Temperatura**

Los parámetros más importantes en el proceso de fermentación son la temperatura y el pH, debido a que el crecimiento de los microorganismos depende de estos, es así que para tener un adecuado desarrollo se debe mantener durante todo el proceso fermentativo una temperatura que puede estar de 15 a 35 °C (Vilca, 2022). Otros autores mencionan que la temperatura óptima es de 30°C (Suárez et al., 2016).

#### **2.4.4 Tiempo de Fermentación**

Tiempo de fermentación se realiza durante un tiempo de 72 horas (Melgarejo et al., 2019). Otros mencionan que el proceso se efectúa en un tiempo de 8 días se agita cuatro veces al día durante 10 minutos para liberar el CO<sub>2</sub> (Montiel y Romero, 2015). Otra de las características es que se debe tener en cuenta, es un proceso que se efectúa en total oscuridad durante un periodo de 8 días (Valdés & Morales, 2017).

#### **2.4.5 Destilación**

Para la destilación se aísla el alcohol del resto de componentes mediante vaporización y condensación selectivas a una temperatura de 78.5°C se empezamos a destilar bioetanol

(Vazquez, 2016). La operación se controla cuidadosamente la temperatura, teniendo en cuenta el punto de ebullición del bioetanol 78°C (Montiel y Romero, 2015).

## 2.5 Bioetanol

Es un biocombustible la composición química, es C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH denominado etanol de biomasa que utiliza en diferentes concentraciones en composición con la gasolina (Montiel y Romero, 2015). Se denomina al producto que se obtiene a partir de fuentes de biomasa vegetal, mieles y jugos ricos en sacarosa, o productos ricos en almidón y a partir de materiales lignocelulósicos (Hernandez, 2017). Además, la obtención del bioetanol es un proceso de fermentación mediante la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en las condiciones adecuadas como es la temperatura a 30°C y el pH 4.5 a 5 (Sardar et al., 2015).

Los países que se han destacados a nivel mundial en la producción de bioetanol se indicará en la siguiente Tabla 5. Además, se muestra las materias utilizadas para estos fines como son el maíz, trigo, yuca, caña de azúcar, remolacha y melaza cabe recalcar que ningún país está produciendo bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos debido que se carece de metodologías, enzimas eficientes que se puedan utilizar dentro del proceso de transformación de celulosa a glucosa para la obtención de bioetanol.

**Tabla 5**

*Clasificación de la Producción de Biocombustibles y Principales Materias Primas*

<b>Países</b>	<b>Etanol</b>	<b>Materiales utilizadas</b>
Estados Unidos	1 (48.2%)	Maíz
Unión Europea	4 (4.9%)	Remolacha azucarera /trigo / maíz
Brasil	2 (26.2%)	Caña de azúcar / maíz
China	3 (8.1%)	Maíz / yuca
India	6 (2.1%)	Melaza
Canadá	7 (1.4%)	Maíz / trigo
Indonesia	21 (0.2%)	Melaza
Argentina	9 (0.9%)	Melaza / maíz
Tailandia	8 (1.4%)	Melaza / yuca
Colombia	13 (0.4%)	Caña de azúcar
Paraguay	14 (0.4%)	Caña de azúcar

*Nota.* Esta tabla fue obtenida (OCDE/FAO, 2020).

### 2.5.1 Bioetanol como Biocarburante

El bioetanol es un biocombustible que puede obtener a través de maíz rico en almidón o caña de azúcar se los denomina a estos de primera generación, también se extraen de los residuos lignocelulósicos conocidos como de segunda generación (Valdés & Morales, 2017). Podemos agregar que el bioetanol es añadido a otras combustibles para mejor sus características, disminuir las emisiones nocivas (García et al., 2016). Utilizadas en diferentes

mezclas de bioetanol 5%, 10%, 15%, 85% y 95% con la gasolina y denominadas E5, E10, E15, E85 y E95 respectivamente (Arcentales & Silva, 2019).

### 2.5.2 Propiedades del Bioetanol

Las características que presenta esta sustancia son inflamable, volátil se encuentra en estado líquido, incoloro, miscible en agua como está dispuesto en la Tabla 6 (Aurora & Vázquez, 2017). Cabe destacar que se puede mezclar con la gasolina en diferentes concentraciones detalladas anteriormente (Arcentales & Silva, 2019). Mientras que E10 es la combinación del 10% bioetanol y 90% gasolina (Shirvani et al., 2020).

**Tabla 6**

*Propiedades Físico-Químicas del Etanol*

Propiedades del combustible	Etanol
Masa Molecular	46.07 g/mol
Punto de ebullición	78 °C
Índice de refracción	1.3611
Acidez	15.9 pKa

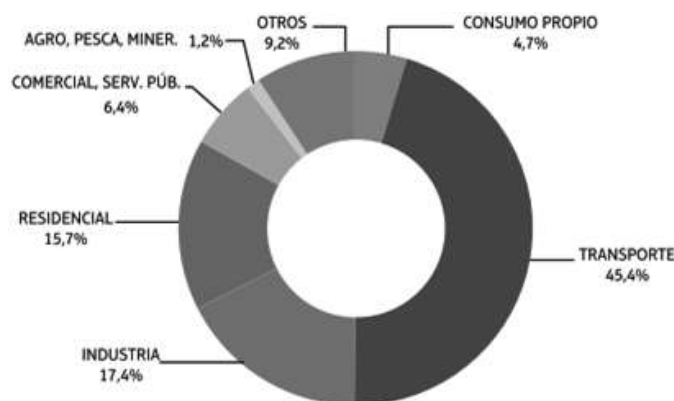
*Nota.* Esta tabla fue obtenida por:(Aurora & Vázquez, 2017)

### 2.6 Consumo de Gasolina en Ecuador

El Ecuador es un país que se ha destacado por el consumo de gasolina, con una mayor demanda el sector transporte terrestre tiene un consumo de 45.4% del total de la energía utilizada, superando notablemente los sectores como son las industrias, residenciales agro pesca y minero. Por tal razón, es de interés el estudio de generar nuevas fuentes de energía como son los biocombustibles para el sector de transporte terrestre merece un especial interés y atención (Instituto de Investigación Geológico y Energético [IIGE], 2021) como muestra la Figura 3.

**Figura 3**

*Participación de los Sectores en el Consumo de Gasolinas 100%*



*Nota.* Consumo en el Ecuador por sectores Fuente: (IIGE, 2021)

En el Ecuador se ha implementado el plan piloto, produciendo alrededor de 80 000 galones diarios de ecopaís. Esto ha demostrado la viabilidad en cuanto a la existencia del mercado y la aceptación del producto, pero la falta de producción de etanol en el país se ha tenido que importar gasolinas de alto octanaje del Perú e igualmente de Bolivia alcohol de 92 grados para cubrir parte de su producción actual según el Centro Ecuatoriano de Derecho Ambiental (CEDA, 2012). La producción de la gasolina en el Ecuador no abastece al mercado, por consiguiente, no tiene la suficiente capacidad para cubrir la demanda interna, por lo cual se ha tenido que importar para cubrir la demanda del país como muestra la Tabla 7 (ARCH, 2021).

**Tabla 7**

*Producción e Importación y Consumo Nacional de Gasolinas*

Años	PRODUCCIÓN (millones de barriles por año)	IMPORTACIÓN (millones de barriles por año)	CONSUMO (millones de barriles por año)	Dólares/barril
2011	8.54	12.60	22.40	102.16
2012	9.53	14.20	23.60	109.24
2013	8.91	16.00	24.90	131.73
2014	6.86	20.10	26.50	120.41
2015	9.60	19.50	27.30	78.48
2016	12.05	15.90	27.60	62.20
2017	12.70	16.40	28.80	72.15
2018	13.00	17.60	30.30	78.99
2019	9.80	20.40	30.20	75.75
2020	8.40	15.50	23.50	62.46
2021	5.90	17.90	38.50	89.16

*Nota:* Esta información explica que el Ecuador siempre ha tenido que importar para abastecer la demanda interna. (EP PETRO ECUADOR y BCE, 2021)

**2.6.1 Consumo de Gasolina en Imbabura por Año**

Datos obtenidos del consumo de gasolina en Imbabura desde el año 2013 hasta el periodo 2021, por otro lado, el Ecuador cuenta con 1 110 estaciones de servicio para abastecimiento de gasolina, de las cuales 36 están ubicadas en dentro de la provincia de Imbabura estas se utilizan para el abastecimiento de los combustibles de las gasolinas extra, súper y diésel. Para ser más específicos se tiene en cuenta la comercialización de la gasolina extra, súper como una reseña histórica desde el año 2013 hasta 2021 como indica la Tabla 8. Además, se puede observar que existe un incremento en todos los años debido al crecimiento automotriz en el año 2021 un consumió de 38.5 millones de barriles a pesar de que en el anterior año fue de 23.5 millones de barriles en el año 2020 en el Ecuador (AIHE, 2021).

**Tabla 8***Análisis del Consumo de Gasolina en la Provincia de Imbabura por Año*

Años	GASOLINA EXTRA			GASOLINA SÚPER		FUENTE
	Población (miles de habitantes)	Volumen (millones de gal)	Intensidad (gal/habitantes)	Volumen (millones de gal)	Intensidad (gal/habitantes)	
2013	433	24.2	56.0	3.7	8.6	(INEC, 2014)
2014	439	25.8	59.0	3.9	8.9	(PETROECUADOR, 2015)
2015	445	26.8	60.3	4.1	9.2	(PETROECUADOR, 2016)
2016	452	27.3	60.4	3.4	7.7	(AIHE, 2017)
2017	458	28.6	62.7	3.1	6.9	(ARCH, 2018)
2018	464	31.1	67.0	2.7	6.0	(AIHE, 2019)
2019	470	31.6	67.4	1.6	3.4	(AIHE, 2020)
2020	476	24.5	51.6	1.1	2.4	(AIHE, 2021)
2021	483	30.4	62.9	1.3	2.8	(AIHE, 2022)

**2.6.2 Situación del Cultivo de Maíz en Imbabura**

Es uno de los cultivos más sembrados dentro de la provincia de Imbabura, y desde la época prehispánica, ha sido el maíz, fréjol, papa, quinua, chocho, mashua y la oca información obtenida de la PREFECTURA DE IMBABURA, (2017). Desde hace mucho tiempo se ha visto el incremento del cultivo de maíz estos datos son obtenidos por el Sistema de Información Publica Agropecuaria (SIPA, 2021). Es un sistema encargado de llevar indicadores sectoriales, cifras territoriales, precios, inclusión financiera, comercio exterior y las cifras agroproductivas que permite conocer la producción de los diferentes cultivos del Ecuador. La Tabla 9 indica la producción de maíz sembradas desde el 2013 al 2021 estos datos permiten conocer la cantidad de hectáreas sembradas de maíz suave choclo y maíz suave seco la materia disponible en la provincia de Imbabura.

**Tabla 9***Superficie Plantada en la Provincia de Imbabura*

Año	Maíz suave seco (ha)	Maíz suave choclo (ha)	Total (ha) plantadas
2013	1 792	669	2 461
2014	3 786	3 715	7 501
2015	4 491	2 434	6 925
2016	5 317	1 759	7 076
2017	4 493	1 375	5 868
2018	5 990	1 147	7 137
2019	4 172	1 445	5 617
2020	4 613	1 015	5 628
2021	3 968	1 521	5 489

**Fuente:** (SIPA, 2021).

### 2.6.3 Evaluación del Rastrojo de Maíz

La provincia de Imbabura tiene una gran producción de maíz, y el estudio realizado por García y Ramírez (2019) permite conocer la cantidad de sustrato que se genera anualmente con un promedio de 9.10 tonsec/ha. También otras de las características son las composiciones en las muestras como es hemicelulosa, celulosa y lignina siendo este el último factor que limita la transformación de bioetanol como se muestra en la siguiente Tabla 10.

**Tabla 10**

*Características a Evaluar de los Residuos de Maíz*

Sitios	tonsec/ha	Hemicelulosa (%)	Celulosa (%)	Lignina (%)
Imbaya	7.11	50.38	38.39	11.23
Natabuela	7.97	72.54	20.97	9.81
San Roque	12.23	71.78	22.94	5.27

Fuente: (García y Ramírez, 2019)

Dentro de la recolección de los residuos de maíz existen tres áreas seleccionadas, que están a diferentes altitudes, precipitaciones, nutrientes del suelo que puede influir en la cantidad de sustrato como se mostró en la anterior tabla, de similar manera en la variación de la cantidad de lignina, hemicelulosa y celulosa como se mencionó en el anterior estudio que influirá en el proceso de obtención de bioetanol.

La biomasa lignocelulósica es compleja, los enlaces covalentes de hemicelulosa y lignina hace una estructura altamente resistente para transformar estos a bioetanol (Jiménez et al., 2017). Los residuos lignocelulósicos varían dependiendo de algunos factores en los que podemos mencionar: la especie, ubicación geográfica, la altitud, los nutrientes del suelo, clima entre otros. Hay que caracterizar que la provincia de Imbabura presenta variaciones de temperaturas según la altitud que va desde 1000 hasta los 4000 m.s.n.m. (Prefectura de Imbabura, 2017). Así como las características de las parroquias donde se realizó el muestreo donde se puede observar son las variaciones de altitud, temperatura y la cantidad de precipitaciones que se conocerá a continuación en la siguiente Tabla 11.



**Tabla 11**

*Características de las Parroquias donde se Realizó el Muestreo*

Parroquias	Altitud	Temperaturas	Precipitaciones
Imbaya	1750 y 2240 m.s.n.m	16°C en la parte alta 18°C en la parte baja Temperatura media anual de 24 °C	612 mm
Natabuela	2360 y 4621 m.s.n.m	8°C en la parte alta 16°C en la parte baja Temperatura media anual de 15°C	635 mm
San Roque	2230 y 4621 m.s.n.m.	8°C en la parte alta 16°C en la parte baja Temperatura media anual de 14°C	1025 mm

*Fuente:*. (Gobierno Municipal de Antonio Ante, 2017).

Datos proporcionados por el Ministerio de Agricultura y Ganadería podemos indicar la cantidad de hectáreas sembradas como una reseña histórica desde el año 2013- 2021 que se ha generado anualmente dentro de la provincia de Imbabura. Además, esta materia no ha tenido el adecuado aprovechamiento para convertirse en bioetanol o fines energéticos como se mostró en la tabla 7.

## 2.7 Marco Legal

Son las leyes que favorecen al desarrollo e implementación de energías renovables, en el campo bioenergía en la producción de bioetanol y comercialización del producto.

### 2.7.1 La Constitución del Ecuador

Los artículos que detallan la utilización de nuevas tecnologías como son la energía renovable con el objetivo de reducir las emisiones de efecto invernadero (Constitución de la Republica del Ecuador, 2015).

**“Art. 15.-** El Estado promoverá, en el sector público y privado, el uso de tecnologías ambientalmente limpias y de energías alternativas no contaminantes y de bajo impacto.”

**“Art. 413.-** El Estado promoverá la eficiencia energética, el desarrollo y uso de prácticas y tecnologías ambientalmente limpias y sanas, así como de energías renovables, diversificadas,

de bajo impacto y que no pongan en riesgo la soberanía alimentaria, el equilibrio ecológico de los ecosistemas ni el derecho al agua” (Constitución de la República del Ecuador, 2008).

### ***2.7.2 Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburíferas***

“**Art.67.-** Sobre la calidad de los combustibles: la gasolina podrá ser mejorada mediante la incorporación de aditivos hasta un equivalente de 2.7% se preferirá y fomentará la producción y uso de aditivos oxigenados, tal como el bioetanol anhidro, a partir de materia prima renovable” (Decreto Ejecutivo 1215, 2010).

### ***2.7.3 Reglamento Autorización Comercialización de Mezclas de Combustibles***

“**Art. 19** PETROECUADOR a través de su filial PETROCOMERCIAL actuará como suministradora de las mezclas de combustibles líquidos derivados de los hidrocarburos con biocombustibles sujetos a este reglamento a las comercializadoras autorizadas” (Ministerio de Recursos Naturales no Renovables, 2010).

“**Art. 11.-**El ejercicio de las actividades de comercialización de las mezclas de combustibles líquidos derivados de los hidrocarburos con biocombustibles sujetos a este reglamento será controlado por la Dirección Nacional de Hidrocarburos, ya sea, directamente o a través de compañías calificadas” (Ministerio de Recursos Naturales no Renovables, 2010).

### ***2.7.4 Decretos Ejecutivos***

“Decreto Ejecutivo No. 146 Declara de interés nacional la producción, comercialización y uso de biocarburantes como componente en la formulación de los combustibles que se consumen en el país, así como la producción agrícola destinada a la preparación de estos” (Ministerio de Recursos Naturales no Renovables, 2010).

“En el Decreto Ejecutivo No. 1879. En el año 2009 se establece el precio fijo de US\$ 0,76 dólares por litro de bioetanol anhidro carburante a nivel de planta industrial, este precio no incluye el Impuesto al Valor Agregado, IVA” (Hernán & Nelson, 2018).

## Capítulo III

### Metodología

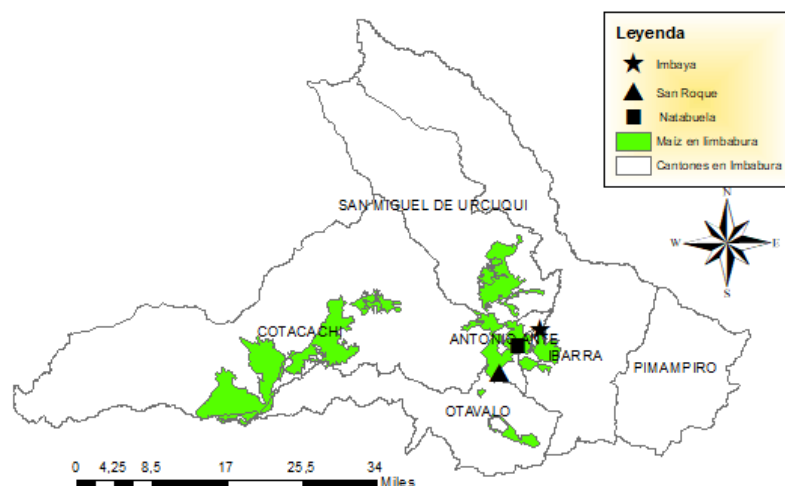
En este capítulo se explica la metodología que se utilizó para la obtención de bioetanol a partir del rastrojo de maíz, como la recolección, secado, trituración, pasteurización e inoculación, tiempo de delignificación con hongos *Pleurotus ostreatus*, hidrólisis ácida, destilación para la obtención de los rendimientos de bioetanol de los tres diferentes sitios y la demanda de gasolina en Imbabura.

#### 3.1 Descripción del Área de Estudio

El estudio constó de dos fases experimentales: fase uno en el campo la recolección del sustrato, fase dos la parte experimental que se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Universidad Técnica del Norte en el campus Antiguo Hospital San Vicente de Paul sede en Ibarra. Se visualizará en la Figura 4 las zonas de producción de maíz suave y la división política de la provincia de Imbabura. Además, el territorio se ha caracterizado por su alta producción de maíz de 6 627 toneladas del grano con una superficie 5 489 hectáreas destinada para estos cultivos (SIPA, 2021).

#### Figura 4

*Distribución Espacial del Cultivo de Maíz en Imbabura*



Nota. Producción de maíz en Imbabura. Fuente: (Ramírez y García, 2019)

### 3.1.1 Selección del Área de Estudio y Elaboración del Mapa

Estos sitios fueron seleccionados después de conocer los antecedentes, sobre el estudio del rastrojo de maíz en la tesis Caracterización de la Biomasa Agro-residual del Maíz (*Zea Mays L*) en la Provincia de Imbabura para Producción de Bioenergía (Ramírez y García, 2019). Además, se tomó con la herramienta Garmin GPSMAP 64sx los datos de las coordenadas, altitudes los datos obtenidos están descritos en la Tabla 12 de los tres sitios de San Roque, Natabuela. e Imbaya en el proceso de recolección del rastrojo de maíz, con los datos obtenidos se elaboró el mapa con el programa ArcMap 10.5.

**Tabla 12**

*Recolección del Residuo de Maíz en Imbabura*

Parroquia	Coordenadas UTM		Altitud
	X	Y	
San Roque	810156	31780	m.s.n.m. 2783
Natabuela	812582	37402	2431
Imbaya	816859	40246	2129

### 3.1.2 Recolección del Residuo

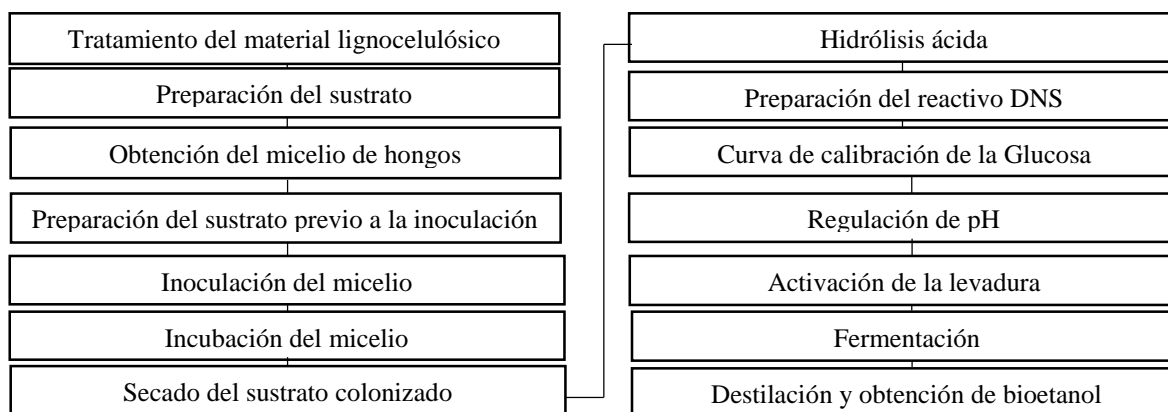
El rastrojo de maíz se adquirió en las parroquias anteriormente mencionadas desarrollando la metodología de Ronquillo & Niño, (2018), donde se delimitó el área de 100 m<sup>2</sup> y se procede a cortar con una hoz los residuos al azar. Después haber realizado la cosecha de la mazorca, obteniendo 15kg de residuos de cada sitio, para este proceso se trabajó con todas las partes de la planta: flores, hojas y tallos.

### 3.2 Flujograma para el Proceso de Obtención de Bioetanol

El Flujograma muestra la información que permite visualizar las etapas que se realizó para la obtención de bioetanol. Donde se utilizó hongos basidiomicetos con el objetivo de reducir el contenido de lignina. Además, en el proceso de hidrólisis ácida se efectuó a diferentes concentraciones y variación de tiempo donde se determinó las condiciones óptimas mediante el método ácido dinitrosalicílico. Consecutivamente se efectuó la fermentación de los jugos glucosados en un periodo de 8 días en un ambiente controlado, el proceso de destilación de bioetanol se realizó a 78°C estos procesos se indicarán en la Figura 5.

**Figura 5**

*Flujograma del Proceso de Obtención de Bioetanol*



### **3.2.1 Tratamiento del Material Lignocelulósico**

El sustrato de maíz fue cosechado con una hoz, se procede a secar de forma natural en exposición del sol en un tiempo de ocho días. Consecutivamente se procede a cortar el rastrojo de 3 a 5cm de diámetros, inmediatamente los residuos fueron guardados en fundas plásticas tanto para los residuos de Imbaya, San Roque y Natabuela previamente designando las letras A, B y C respectivamente.

### **3.2.2 Pretratamiento Mecánico Para el Sustrato**

Es un pretratamiento mecánico que se realiza a los sustratos con el objetivo de incrementar el grado de polimerización con un molino de corte marca (pulverisette fritsche) para reducir el tamaño de la partícula obteniendo muestras de 2 mm siguiendo la metodología descrita por Rezania et al., (2020). Esto se realizó con los rastrojos de los diferentes sitios, para evitar que se mezclen estas muestras se codificaron con sus respectivas letras, como se describe en el anexo A.

### **3.2.3 Obtención del Micelio de Hongos**

El micelio se adquirió a la empresa INTIWASI que presenta todos los productos en la siguiente página web (<https://intiwasi-ec.com/>) son productos naturales, encargada a la reproducción de hongos, y comercialización de semillas de diferentes especies. Además, se guardó el micelio, en refrigeración a una temperatura de 4°C hasta su utilización. Con el propósito de la conservación del micelio se utilizó un medio de cultivo para hongos PDA (Potato Dextrose Agar) metodología establecida por Sardar et al., (2015).

Por tal motivo, se realizó réplicas del hongo *Pleurotus ostreatus* para la preservación de la especie, degeneración y evitar el envejecimiento. Posteriormente, se utilizaron 3 cajas petri con medio PDA como indica en el anexo B, donde se procedió a sembrar un grano de micelio de *Pleurotus ostreatus* en el medio. Además, el proceso de incubación se desarrolló a una temperatura constante de 25°C en total oscuridad, al mismo tiempo, se evaluó el tiempo de colonización dentro de la caja petri y tomando mediciones de crecimiento cada tres días con un pie de rey digital para medir en forma radial la colonización de los hongos, se realizó como lo indicó Cotes et al., (2022) y García et al., (2020).

### **3.2.4 Preparación del Sustrato Previo a la Inoculación**

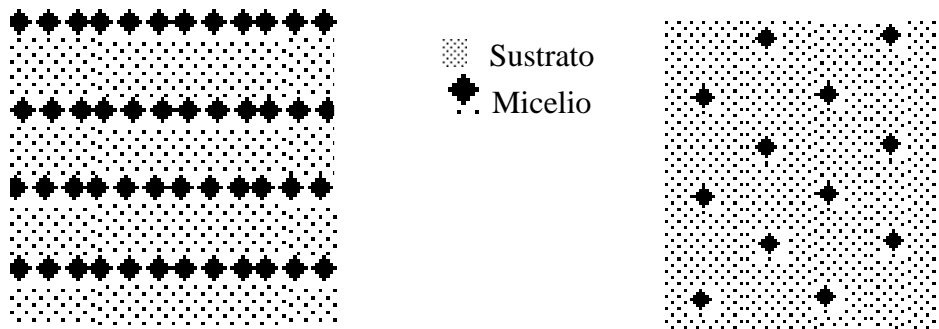
Las condiciones óptimas para el desarrollo del micelio en el sustrato el factor principal es la humedad que se debe mantener en un 65%, para llegar a esta concentración de humedad se utilizará 300 ml de agua para 100 g de sustrato seco, y con respecto al pH se trabajó con 5 utilizando la colocación de Cal (CaO) y Yeso al 0.5% por cada 100 g de peso húmedo, se efectuó el proceso reportado por Holgado et al.,(2019). Además, se replicó el proceso con las muestras de los tres sitios. Con la finalidad de eliminar microorganismos presentes en el sustrato se llevó a autoclave durante 1 hora, a una presión de 15 psi y a una temperatura de 121°C para el crecimiento adecuado del micelio, con un total de 48 tratamientos todo el proceso se describe en el anexo C se basó en el metodología de Filippi et al., (2019).

La inoculación del micelio en el sustrato se trabajó a una temperatura de 22°C dentro de una cámara de flujo laminar con la mayor asepsia para evitar contaminaciones, colocando 5% micelio con la relación del peso húmedo donde se utilizó el método de Ruby et al., (2015).

### **3.2.5 Inoculación del Micelio en el Sustrato**

El proceso constó de tres sustratos provenientes de San Roque, Natabuela, e Imbaya que fueron inoculados con *Pleurotus ostreatus* En esta actividad se aplicó dos técnicas de sembrado como indica la Figura 6: La primera técnica de voleo se basa en colocar el sustrato y micelio consecutivamente en capas superpuestas y en la parte superior se colocó una liga, utilizando la técnica indicada por Donado, (2014). En el segundo el sustrato se utilizó técnica de siembra tresbolillo donde se aplano el sustrato y ubico el micelio en las dos caras laterales y sellándolo con cinta adhesiva se realizó la metodología descrita por Fajardo et al., (2022) y Vargas & Lopez, (2019)

**Figura 6**  
**Inoculación con Micelio Técnica (a) y (b) en Sustrato de Maíz**



### 3.2.6 Incubación del Micelio en el Sustrato

El proceso de incubación del micelio de *Pleurotus ostreatus* se realizó en un cuarto oscuro provisto de un calefactor para mantener la temperatura de 28°C y la humedad del 65% (García et al., 2021). Aproximadamente la colonización total del micelio se realizará en un periodo de cinco semanas (Varnero et al., 2015).

### 3.2.7 Secado del Sustrato Colonizado

Se realizó en la estufa a una temperatura de 105°C tomando 3 muestras de 25g de cada sitio, registrando el peso en intervalos de una hora hasta estabilizar las muestras donde se determinó el contenido de humedad, utilizando la metodología de Santana et al., (2017). El porcentaje de humedad se obtiene por diferencia de pesos utilizando la siguiente fórmula.

$$\%H = \frac{pi - ps}{pi} * 100$$

Donde:

%H= porcentaje contenido de humedad

*pi* = peso inicial

*ps* = peso seco

Además, el resto de las muestras fueron secadas a la temperatura pertinente y consecutivamente trituradas en una pulverizadora (fritsche) obteniendo residuos de 0.5 mm y guardado en fundas. Este proceso se utilizó para evitar contaminación en las muestras por diferentes elementos patológicos como por ejemplo el *penicillium*.

### **3.2.8 Hidrólisis Ácida**

Basados en la metodología de Montañez et al., (2014) mediante el diseño experimental de Box-Behnken donde se determinó los parámetros constantes: la temperatura de 121°C, la presión de 15 psi y una relación sólido líquido de 1:10 p/v. Las variables a seleccionar son el tiempo de 15 y 30 minutos y la concentración de ácido de 1, 2, 4 y 6 (%) como referencia a la metodología de Congsomjit & Areeprasert, (2021). Cabe recalcar que cada experimento se realizó por triplicado obteniendo 72 unidades experimentales para los sustratos de los tres sitios, luego se seleccionó el mejor tratamiento que fue a una concentración de 1% de ácido mediante al análisis estadístico en el programa Infostat con un 5% de error, todo proceso esta descrito en el anexo D.

### **3.2.9 Regulación del pH**

Los jarabes glucosados que fueron obtenidos se reguló el pH a 3, 4 y 5 para las diferentes muestras de los tres sitios obteniendo 27 unidades experimentales para realizar el proceso de fermentación con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Para esto se utilizó un pH metro para medir e igualar a lo requerido, se añadió Hidróxido de Sodio (NaOH) 2 molar (M) para aumentar el pH basados en la metodología descrita por Domínguez et al.,(2015). Esta concentración se ha utilizado para estabilizar las demás muestras, siguiendo la técnica, que para obtener esta solución se necesitó 8g de NaOH en 100ml de agua destilada y se procedió a guardar la solución en un frasco ámbar hasta la utilización.

### **3.2.10 Activación de la Levadura**

Para activar la levadura se utilizó 20ml de agua tibia, se adiciona 0.4g de levadura activa seca, 3g de azúcar y se deja reposar a una temperatura ambiente reposar 15min, para después colocar en cada biorreactor 10ml de inóculo como lo indicó Gómez et al., (2015). Cabe recalcar que la levadura utilizada, se cultivó en condiciones anaeróbicas a la temperatura de 30°C utilizando las condiciones de Melgarejo et al., (2019).

### **3.2.11 Fermentación**

Se utilizó matraces de 125 ml, que fueron sellados con un tapón de caucho y una manguera para eliminar el CO<sub>2</sub> producido durante el proceso de fermentación, este proceso se realizó en una incubadora con agitación a una temperatura constante de 30°C y a 200 rpm, realizado en un periodo de ocho días (Montiel y Romero, 2015). Los parámetros a seguir fueron



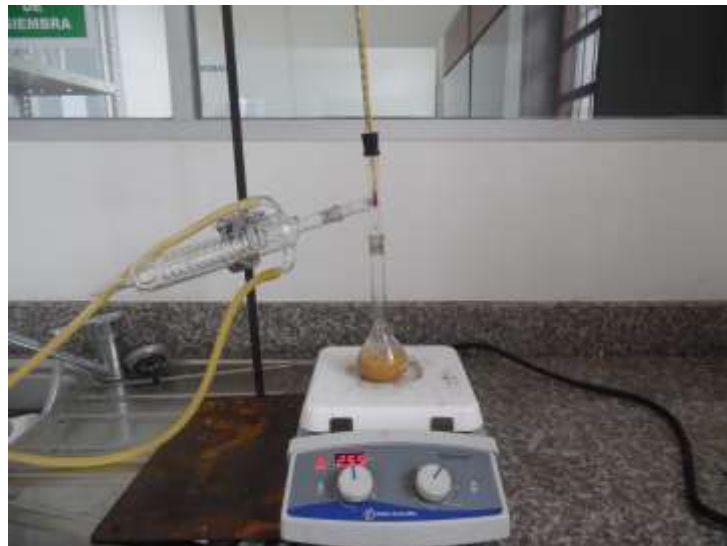
la concentración 50ml de ácido sulfúrico a una concentración del 1% trabajando con una masa de 5 g del material delignificado una relación 1:10 sólido líquido se obtuvo los jarabes glucosados regulados el pH 3, 4 y 5 e inoculados con 10ml de levadura activada.

### **3.2.12 Destilación**

Este proceso se efectuó con un equipo de destilación, donde se colocó el líquido fermentado en un matraz aforado de 100ml y se procedió a destilar el bioetanol a una temperatura de 78°C como muestra la Figura 7. Este producto se tomó en tubos eppendorf, además, el equipo consta de un termómetro que permite observar la variación de temperatura que se debe mantener a 78°C utilizando la metodología de Montiel y Romero (2015). El proceso de fermentación y destilación están dispuestos en anexo F.

#### **Figura 7**

*Destilación de Bioetanol*



### **3.3 Materia Prima con Potencial para la Producción de Bioetanol en la Provincia de Imbabura**

El potencial de residuos que no fueron aprovechados y generados dentro de la provincia de Imbabura como una reseña histórica desde el año 2013 al 2021 esta información se encuentra en el SIPA de los respectivos años mencionados. A la vez, se conoce mediante el estudio de Ramírez y García (2019) la cantidad de residuos que se ha generado en una hectárea que es de 9.10 tonsec/ha. Hay que tomar en cuenta que no se puede utilizar toda la materia para fines energéticos, se debe prevenir la erosión de los suelos dejando el 30% de residuos en el área como se muestra en la Tabla 13 (Velázquez et al., 2017). Para el año 2021 la provincia de

Imbabura cultivo 5 489 hectáreas de maíz dejando el 30% del sustrato en el suelo el aporte con los residuos de maíz es de 34 978 tonsec de materia para producir bioetanol.

**Tabla 13**

*Perspectiva de la Producción Agrícola*

Año	Total (ha)	tonsec	30% Materia	tonsec
2013	2 461	22 403	6 721	15 682
2014	7 501	68 284	20 485	47 799
2015	6 925	63 041	18 912	44 128
2016	7 076	64 415	19 325	45 091
2017	5 868	53 418	16 026	37 393
2018	7 137	64 970	19 491	45 479
2019	5 630	51 252	15 376	35 876
2020	5 809	52 881	15 864	37 017
2021	5 489	49 968	14 990	34 978

Nota. *tonsec es igual a toneladas secas*

### 3.3.1 Rendimientos de Etanol

El microorganismo comúnmente utilizado *Saccharomyces cerevisiae*, en el proceso de fermentación para la obtención de etanol con unos rendimientos cercanos al máximo teórico (0.51ml/g) (Virreira et al., 2014). En la evaluación del proceso se usan diferentes indicadores, el primero de ellos es el rendimiento volumétrico ( $\eta_m$ ), que se define como el volumen del etanol obtenido ( $v$ ) por gramo de materia prima ( $mp$ ) usada en base seca (Robles et al., 2018).

$$\eta_m = \frac{v}{mp} \times 100$$

$\eta_m$  =Rendimiento de alcohol obtenido

### 3.3.2 Evaluación del Bioetanol con Respecto a los Sitios

Se utilizó el Software InfoStat utilizado para el análisis estadístico donde admiten 3 tipos básicos de variables: Numéricas, Categóricas y Fechas. Además, tiene un avanzado sistema que permite un alto nivel de productividad (Robledo et al., 2014). El análisis estadístico que se realizó con respecto a la evaluación de los tres sitios, con un error del 5% por el cual el análisis es no paramétrico.

### 3.4 Análisis del Aporte de Bioetanol E10 en Imbabura

Dentro del primer objetivo obtendremos los rendimientos de etanol que nos permiten extrapolar con la cantidad de materia disponibles teniendo en cuenta que un 30% de los

residuos tienen que quedarse en el suelo para evitar la erosión se seleccionó este método utilizado por Velázquez et al., (2017) con la producción de bioetanol que se generaría si fueran tratados adecuadamente, realizamos una extrapolación de etanol con respecto al rastrojo de maíz generado teniendo en cuenta que la producción a nivel industrial presentara una pérdidas de 0.8% según Oliva & Ballesteros,( 2015) se realizó la comparación de la producción generada versus la demanda dentro de la provincia de Imbabura como se indicó anteriormente en la tabla 8 el consumo de gasolina en la provincia de Imbabura.

## Capítulo IV

### Resultados y Discusión

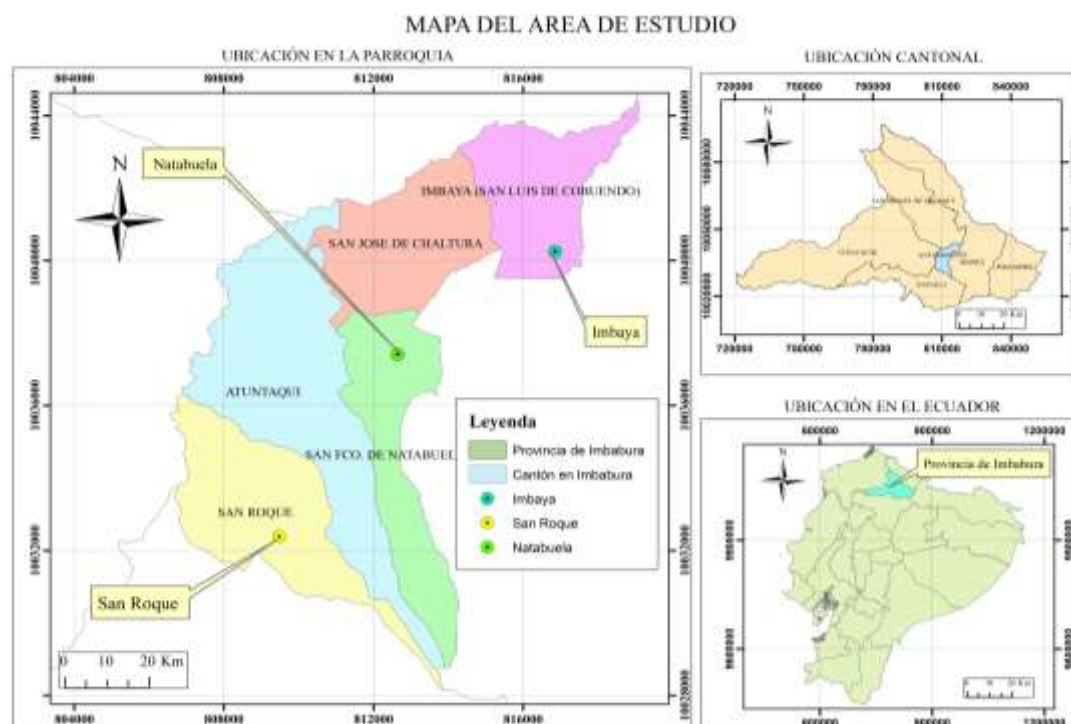
En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en el proceso de la investigación de acuerdo con los objetivos propuestos.

#### 4.1 Distribución Aleatoria del Maíz

Las muestras de maíz obtenidas en tres sitios están indicadas en el mapa de Imbabura e ilustradas en la Figura 8. Según Arellano y Houbrom, (2015) indicó que la composición de los residuos lignocelulósicos varía de acuerdo a la temperatura y precipitaciones. La temperatura promedio de Imbabura va desde 13°C a 27°C y los datos obtenidos por Gobierno Municipal de Antonio Ante (2017) muestran la temperatura promedio de los sitios de estudio de San Roque 14°C, Natabuela 15°C e Imbaya 24°C (Grover et al., 2015). Otro factor son las precipitaciones que afectan con relación a la materia seca generada, es así que en San Roque hubo 1025 mm/mes, Natabuela 635 mm/mes e Imbaya 612 mm/mes, además se ha demostrado que mientras más frecuencia de precipitaciones aumenta la producción de residuos de biomasa a un estimado de 12.23 tonsec/ha en San Roque como lo demostraron Ramírez y García (2019).

#### Figura 8

*Mapa del Área de Estudio*



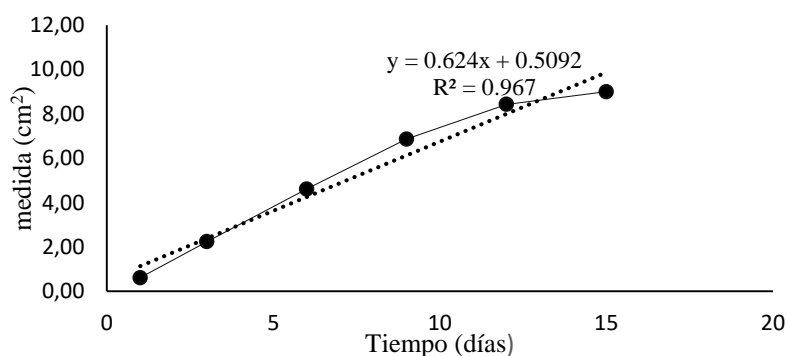
*Nota.* Ubicación provincial, cantonal y parroquial

## 4.2 Réplicas de Hongos *Pleurotos ostreatus* en PDA

Cabe recordar que el periodo de crecimiento del hongo en el medio PDA fue de 15 días, y al tercer día se midió 0.62 cm<sup>2</sup>, al noveno día fue de 6.86 cm<sup>2</sup> y en el décimo quinto día la colonización fue total en la caja petri el crecimiento en cm<sup>2</sup> por días del hongo como se muestra en la Figura 9. Por otro lado, obteniendo un coeficiente de determinación lineal de R<sup>2</sup> = 0.967 lo que significa que el crecimiento cumple rigurosamente una tendencia lineal. También Cañedo y Ames (2014) afirman que el hongo *Pleurotus djamor* realizó una colonización total en caja petri en un mismo medio en un periodo de 20 días. Después de tiempo determinado se tiene una cepa pura que a la vez puede ser utilizada para diferentes fines como la elaboración de micelio para la producción, comercialización como lo menciona Tinoco y Sanchez (2022).

**Figura 9**

*Colonización del Hongo en PDA*



## 4.3 Estandarización del Sustrato previo a la Inoculación

Se determinó que para las siguientes masas de 200, 250 y 350 (g) la cantidad adecuada de agua destilada es de 600, 750 y 1050 (ml) respectivamente (Ruby et al., 2015). En la investigación se trabajó con masas de 800, 1000 y 1400 (g) respectivamente, se colocó cal y yeso 4, 5 y 7 (g) a estos sustratos mencionados que permitió un óptimo crecimiento del hongo en el sustrato (Holgado et al., 2019).

**Tabla 14**

*Estandarización del Pretratamiento del Sustrato*

Cantidad de masa (g)	Tamaño de partícula (mm)	Agua destilada (ml)	Masa peso húmedo (g)	Nº de tratamientos	Cal (g)	Yeso (g)	No. Muestras tomadas	Total
200	2	600	800	4	4	4	3	12
250	2	750	1000	5	5	5	3	15
350	2	1050	1400	7	7	7	3	21

*Nota.* Características adecuadas para el sustrato previo a la inoculación

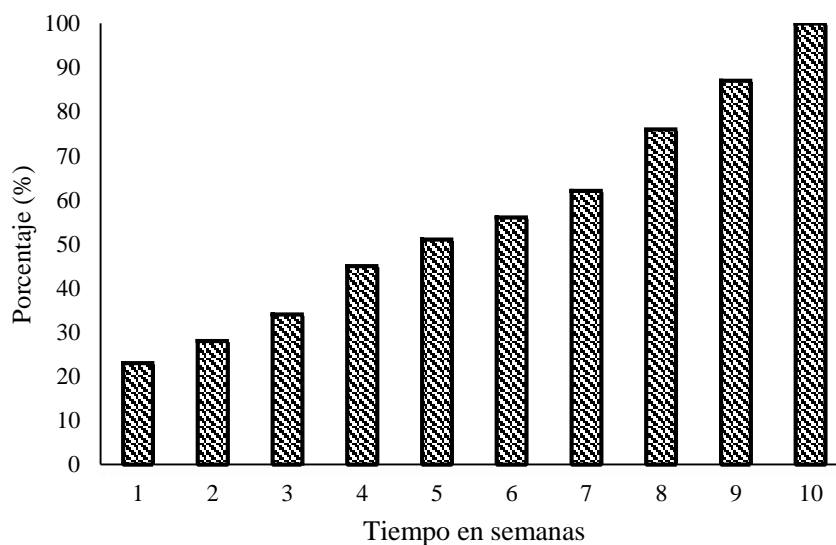
#### 4.4 Incubación del Micelio

La técnica (a) tiene un tiempo de colonización de 10 semanas (Donado, 2014). La técnica (b) tiene un tiempo de colonización de 5 semanas obteniendo óptimos resultados con esta la siembra tresbolillo (Vargas & Lopez, 2019). Después de aplicar las dos técnicas se concluye que la técnica (b) es más eficiente, la misma que se utilizó en todo el proceso de delignificación, y esto se debe a la colocación de las semillas y al tener una adecuada distribución del micelio en el sustrato. La técnica (a) al haber sido una siembra de capas con micelio, estas fundas con sustrato presentan un diámetro del lateral con el opuesto tiene una distancia de 5cm aproximadamente que influyó en el crecimiento para que este no sea uniforme, mientras que el segundo tiene un diámetro lateral con el opuesto de 2cm.

Para aumentar la eficiencia del crecimiento del micelio el sustrato tiene que ser rico en fibra y carbohidratos para un mejor desarrollo (Ruby et al., 2015). Otros autores mencionan la relación C/N donde utilizan diferentes concentraciones como aserrín, caña de azúcar, restos de café para los tallos de maíz obteniendo una colonización de 5 semanas (Garzón & Cuervo, 2015). En otro estudio para aumentar el nitrógeno se utilizó salvado de trigo en las muestras de maíz (Juma y García, 2019). En este estudio no influye la relación C/N, es más determinante manejar la distribución de micelio en el sustrato.

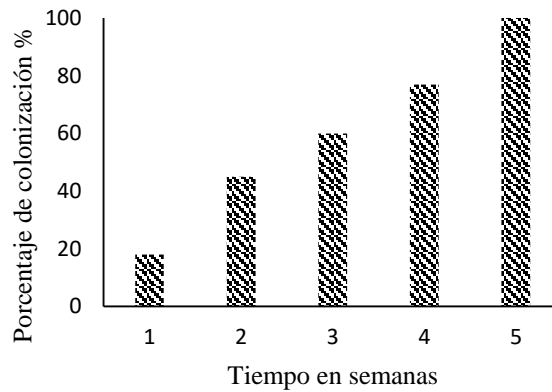
#### Figura 10

*Técnica (a) Tiempo de Colonización en el Sustrato*



## Figura 11

*Técnica (b) Tiempo de Colonización en el Sustrato*

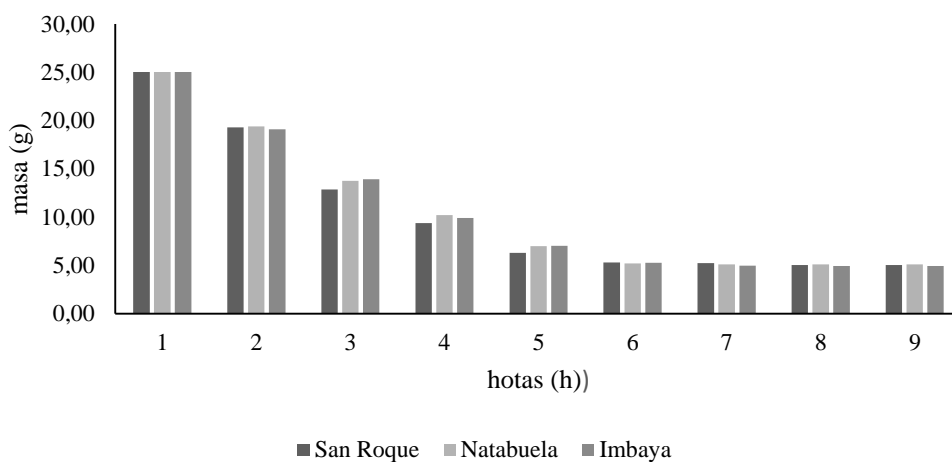


### 4.5 Secado del Sustrato Colonizado

Los diferentes sustratos delignificados fueron secados en un tiempo de nueve horas con masa de 25g para los tres sitios como indica la siguiente Figura 12. Esta figura muestra el tiempo de secado del sustrato de los tres sitios evaluados. Los sustratos estuvieron expuestos a condiciones similares durante todo el proceso de delignificación, como fue la humectación del sustrato, incubación del micelio en la misma área manteniendo la temperatura y la humedad igual, dando como resultado un tiempo de secado de 9 horas.

**Figura 12** *Tiempo de Secado del Material Delignificado*

*Tiempo de Secado del Material Delignificado*



Además, los tiempos de secado son similares para los tres sitios, mientras que en otros estudios como de Ramírez y García (2019), varía dependiendo de la muestra como fue el tallo del maíz con 12 horas, mientras que las hojas de maíz tienen un tiempo de secado de 4 horas y 30 minutos esto obedecerá al tamaño y características de las muestras teniendo en cuenta que de los tres sitios el diámetro de las ejemplares es de 2cm. La humedad de los sustratos está

indicada en la siguiente Tabla 15 teniendo como una humedad media para los residuos de San Roque es de 80.04% para Natabuela es de 79.78% e Imbaya 82.31% la humedad influye en los rendimientos de bioetanol a mayor cantidad de humedad el rendimiento baja.

**Tabla 15**

*Contenido de humedad de los sustratos delignificados*

Sitios	Peso inicial (g)	Peso final ( g)	Contenido de Humedad (%)
San Roque	25	4.83	80.68
	25	5.29	78.84
	25	4.99	80.04
Natabuela	25	5.09	79.64
	25	5.08	79.68
	25	5.07	79.72
Imbaya	25	5.49	78.04
	25	4.47	82.12
	25	4.92	80.31

#### **4.6. Evaluación de Hidrólisis Ácida**

En la concentración de azúcares se obtuvo los siguientes resultados para una concentración de 1% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en un tiempo de 30 minutos para los residuos de San Roque 1.490 mg/ml, Natabuela 1.345 mg/ml e Imbaya 1.343 mg/ml. Si se trabaja a concentraciones del 6%, se observó que la concentración de azúcares disminuye para San Roque 0.327 mg/ml, Natabuela 0.322 mg/ml e Imbaya 0.247 mg/ml caso contrario en un tiempo de 15 minutos se ha determinado la concentración disminuye para San Roque 1.119 mg/ml, Natabuela 0.970 mg/ml e Imbaya 0.746 mg/ml demostrando que la concentración adecuada es al 1% y se trabajó a esta solución a todos los sustratos en un tiempo de 30 minutos. Se seleccionó el adecuado tratamiento de la concentración de ácido sulfúrico y tiempo, mediante el test: LSD Fisher demostrando que se obtienen óptimos rendimientos a la concentración de 1% y con relación a la variación de tiempo es de 30 min se puede observar que presentan diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en todos los sitios de estudio. Además, los datos obtenidos están en el Anexos E. Se observa que para efecto de concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, al aumentar ésta la concentración de azúcares reductores disminuye (Morales et al., 2021). Otras investigaciones se han realizado a una concentración de 0.5% se obteniendo máximos rendimientos (Arellano & Houbrom, 2015).

Congsomjit & Areeprasert, (2021) y Jiménez et al., (2018) también coinciden que la concentración adecuada es al 1%. En esta investigación se ha demostrado que el aumento de la concentración de ácido sulfúrico disminuye la concentración de azúcares reductores en las muestras, como se indica en la siguiente Tabla 16.



**Tabla 16** *Contenido de Glucosa en las Muestras de Hidrólisis Ácida*

<i>Contenido de Glucosa en las Muestras de Hidrólisis Ácida</i>					
t (min)	Ácido Sulfúrico (%)	SR Concentración (mg/ml)	N Concentración (mg/ml)	I Concentración (mg/ml)	
30	1	1.490	1.345	1.343	
15	1	1.119	0.970	0.746	
30	2	0.914	0.994	0.878	
15	2	0.863	0.650	0.366	
30	4	0.642	0.594	0.531	
15	4	0.341	0.298	0.271	
30	6	0.327	0.322	0.247	
15	6	0.254	0.221	0.138	

*Nota:* t: tiempo SR: San Roque, N: Natabuela e I: Imbaya

#### 4.7 Rendimiento de Etanol

El bioetanol que se generó a partir de 5g de residuos delignificados se obtuvo los siguientes rendimientos de bioetanol extrapolando para 1 g de los diferentes sitios de estudios que se observa en la Tabla 17 la temperatura influye cuando es menor los rendimientos aumentan. Los rendimientos mínimos de bioetanol se obtuvieron a partir de un pH de 3 para Natabuela e Imbaya que es de 0.10 ml de etanol por g de residuos delignificados, mientras que para San Roque es de 0.13 ml/g los rendimientos máximos se realizó con un pH de 5 obteniendo 0.25 ml/g de etanol por cada gramo de residuos delignificados para los residuos de San Roque otros estudios se han obtenido con residuos de moringa se produjeron 0.13 ml de etanol por cada gramo de moringa seca obteniendo un rendimiento similar con los residuos para un pH de 4 en Imbaya y Natabuela (Tudge et al., 2021).

El análisis no paramétrico mediante la prueba de Friedman demostró que el rendimiento óptimo de etanol se obtiene con un pH 5 y a la vez lo indica Domínguez et al., (2015). Además, es un factor que permite evidenciar que influye para el crecimiento de la levadura, en la transformación de los azúcares reductores a bioetanol. Para los sitios de Imbaya y Natabuela estos no presentan variación de rendimiento de etanol como una media general, teniendo 0.72 ml por cada 5 g, sin embargo, es mínimo con respectó a San Roque. Se presenta como media general 0.86 ml de bioetanol a partir de 5g estos datos están en Anexo F.

**Tabla 17**

<i>Obtención de Bioetanol con Rastrojo de Maíz</i>		
Tratamiento	Bloque	Respuesta ( ml/g)
pH3	N	0.10
pH4	N	0.13
pH5	N	0.21
pH3	I	0.10
pH4	I	0.13
pH5	I	0.21
pH3	S	0.13
pH4	S	0.14
pH5	S	0.25

El factor que influye en estos resultados es la concentración de lignina como se ha indicado en la anterior Tabla 11 en el estudio de Ramírez y García (2019), donde presenta los residuos de San Roque con menos concentración de lignina con 5.27% mientras que los residuos de Natabuela 9.81% y finalmente Imbaya con 11.23%. Otro factor que interfiere en el proceso de obtención de bioetanol y que se vio en el presente estudio es que a mayor concentración de lignina disminuye el rendimiento de etanol y también lo indica Rezanía et al., (2020). Los rendimientos de bioetanol se obtuvieron a partir de los datos obtenidos mediante la prueba de LSD Frisher y se ha determinado para un gramo obteniendo los siguientes resultados obteniendo 0.17 ml/g para los residuos de San Roque y similar para el rendimiento para Natabuela e Imbaya de 0.14 ml/g.

#### 4.9 Extrapolación del Bioetanol para una Tonelada

Después de obtener los rendimientos de bioetanol se procedió hacer el cálculo para una tonelada para este proceso no se realizó con el rendimiento óptimo que fue de 0.86ml obtenidos con 5 gramos en San Roque. Para la extrapolación se hizo con las cantidades de bioetanol de 0.72ml obtenidas de Natabuela e Imbaya al no tener diferencias significativas entre ambos residuos dentro de la provincia de Imbabura. Extrapolamos para una tonelada de rastrojé de maíz que producirá 172 l/ha. Otros estudios demuestran la producción de bioetanol es de 40 litros de bioetanol por tonelada de sorgo (Rogel & Ayala, 2017). Se calculó los litros de bioetanol que se generarían anualmente por toneladas de materia seca como se muestra en la siguiente Tabla 19. La producción a nivel industrial presenta pérdidas del 0.8% por deficiencia del proceso como las reacciones de la levadura (Oliva & Ballesteros, 2015), asimismo se transformó de litros a galones donde la equivalencia de un galón es igual a 3.79 litros para el año 2021 tendremos una producción de 1.57 millones de galones transformando los residuos a bioetanol.

**Tabla 18**

*Perspectiva de Bioetanol que se Genera Anualmente en Imbabura*

Año	Materia en miles de (tonsec)	Millones de (l) de bioetanol	Pérdida (l)	Millones de (l) bioetanol	Bioetanol en millones de (gal)
2013	15.67	2.69	21 570	2.67	0.70
2014	47.78	8.21	65 747	8.15	2.15
2015	44.11	7.58	60 698	7.52	1.98
2016	45.07	7.75	62 021	7.69	2.03
2017	37.37	6.42	51 433	6.37	1.68
2018	45.46	7.81	62 556	7.75	2.04
2019	35.78	6.15	49 233	6.10	1.61
2020	35.85	6.16	49 330	6.11	1.61
2021	34.96	6.01	48 111	5.96	1.57

*Nota.* La pérdida es de 0.8%

#### 4.10 Ahorro de combustible en la provincia de Imbabura

La provincia de Imbabura en los años 2013 hasta el 2021 se ha incrementado el consumo de gasolina por el crecimiento automotriz demandando más este recurso, en los años 2020 y 2021 se ha visto una disminución debido a la pandemia de COVID-19. Al convertirlos residuos agrarios en bioetanol estaría generando anualmente 1.8 millones de galones de bioetanol anualmente dentro de la provincia de Imbabura con la utilización del rastrojo de maíz cabe indicar que la producción no abastecería con la demanda en ningún año específicamente y para el año 2021 el volumen consumido fue de 30.40 millones de galones y la producción a partir de residuos sería de 1.57 millones de galones como se muestra en la Tabla 19.

**Tabla 19**

*Consumo de Gasolina en la Provincia de Imbabura y Producción de Bioetanol*

Años	Consumo en (millones de gal)	Producción de bioetanol con rastrojo de maíz en (millones de gal)	Utilización del 10% de bioetanol en (millones de gal)
2013	24.20	0.71	2.42
2014	25.89	0.22	2.59
2015	26.83	0.19	2.68
2016	27.30	2.03	2.73
2017	28.69	1.68	2.86
2018	31.10	2.04	3.11
2019	31.68	1.61	3.16
2020	24.57	1.61	2.45
2021	30.40	1.57	3.04

#### 4.11 Aporte Económico al País

Ecuador tiene que importar nafta de alto octano para cubrir la demanda de combustibles dentro del país teniendo que destinar los recursos ecuatorianos para este fin, otro factor son los subsidios otorgados por el Gobierno parte de la economía de los recursos monetarios se ha destinado a esta actividad (Hernán y Nelson, 2018). En la Tabla 20 se observará los galones que se generan a partir de los residuos de maíz dentro de la provincia de Imbabura. A la vez estos se transforman a barriles teniendo en cuenta que 1 barril es igual a 42 galones y el costo ingresos que beneficiarían al país con la implementación y desarrollo de los biocombustibles de segunda generación el ahorro que presentara al país es de 3.35 millones de dólares para el año 2021.

**Tabla 20***Ahorro Económico*

Años	Producción Anual de bioetanol (galones)	Barriles producidos	Dólares/barril	Ahorro en millones de dólares
2013	0.71	16 824	131.73	2 .22
2014	2.15	51 280	120.41	6 .17
2015	1.99	47 342	78.48	3 .72
2016	2.03	48 374	62.20	3 .01
2017	1.68	40 116	72.15	2 .89
2018	2.05	48 791	78.99	3 .85
2019	1.61	38 400	75.75	2 .91
2020	1.61	38 475	62.46	2 .40
2021	1.57	37 525	89.16	3 .35

## Capítulo V

### Conclusiones y Recomendaciones

#### 5.1 Conclusiones

A nivel de laboratorio se ha demostrado que la técnica de siembra tresbolillo es más eficiente en el proceso de delignificación además en la hidrólisis ácida se ha confirmado que la glucosa máxima se obtiene a una concentración del 1% en el tiempo de 30 minutos y finalmente en el proceso de fermentación se definió que en el pH 5 se consiguen los mejores rendimientos en el proceso de obtención de bioetanol.

Los rendimientos de bioetanol son 0.17ml/g con los residuos de San Roque, mientras que Imbaya y Natabuela presentan un similar rendimiento de 0.14ml/g. Demostrando la hipótesis alternativa donde el rendimiento de bioetanol con rastrojo de maíz es diferente para cada zona de estudio, sin embargo, la biomasa residual de Imbaya y Natabuela son similares.

La aportación de bioetanol con rastrojo de maíz tratados adecuadamente alcanza a generar 1.58 millones de galones que solo abastecería cubrir el 51.84%, mientras que la demanda de la gasolina dentro de la provincia de Imbabura en el año 2021 que es de 30.4 millones de galones por lo que no cubriría la demanda local y habría que utilizar otras materias primas como bagazo y rastrojo de frejol.

#### 5.2 Recomendaciones

Se debería tratar el proceso de hidrólisis ácida con diferentes variaciones de tiempo experimentando a 30 60 90 min para conocer cómo influye en este proceso para la obtención de bioetanol, debido a que diferentes autores indican que a más tiempo aumenta la concentración de azúcares.

Al realizar otros estudios se tendría que variar los sitios más dispersados como son Cotacachi, Ibarra y Pimampiro por variaciones de altitudes, temperaturas y suelos.

Se convendría realizar estudios sobre el frejol con un alto potencial para generar bioetanol y cubrir la demanda dentro de la provincia de Imbabura.

Previo al proceso de secado se debería aprovechar el proceso de fructificación, si se llevara en condiciones óptimas se obtendría cuerpos fructificados en un periodo de 15 días generando fuentes de alimentación.

## Referencias

- Abo, B. O., Gao, M., Wang, Y., Wu, C., & Wang, Q. (2019). *Lignocellulosic biomass for bioethanol: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes*. <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1515/reveh-2018-0054>
- AIHE. (2021). El Petróleo en cifras 2020. In *El Petróleo en cifras*.
- Angulo, F. M., Mamani, B., & Nova, M. (2022). Crecimiento in vitro de hongo ostra (pleurotus ostreatus) en diferentes medios de cultivo. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales, Bolivia*, 9, 0–2. <http://www.scielo.org.bo/pdf/riiarn/v9n1/2409-1618-riiarn-9-01-10.pdf>
- Arcentales, D., & Silva, C. (2019). Exploring the introduction of plug-in hybrid flex-fuel vehicles in Ecuador. *Energies*, 12(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/en12122244>
- Arellano, C., & Houbrom, E. (2015). *Obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos sometidos a hidrólisis enzimática*. (tesis de maestría). Universidad Veracruzana, Veracruz, Mexico.
- Aurora, T. :, & Vázquez, G. (2017). *Estudio de la obtención de bioetanol a partir de diferentes tipos de biomasa lignocelulósica*. (tesis de pregrado) Universidad de Cantabria, Cantabria, España.).
- Brinkman, M., Levin-Koopman, J., Wicke, B., Shutes, L., Kuiper, M., Faaij, A., & van der Hilst, F. (2020). The distribution of food security impacts of biofuels, a Ghana case study. *Biomass and Bioenergy*, 141. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105695>
- Caballero, J., Moreno, A., Reyes, J., García, J., López, W., & Jiménez, J. (2017). *Competencia del uso del rastrojo de maíz en sistemas agropecuarios mixtos en Chiapas \* Competition of the use of corn stubble in mixed farming systems in Chiapas Resumen Introducción*. 8, 91–104. <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v8n1/2007-0934-remexca-8-01-91.pdf>
- CEDA. (2012). Reflexiones en torno al paradigma de los biocombustibles. In *Algarrobo-MEL*. Recuperado de <http://revistas.uncu.edu.ar/ojs/index.php/mel/article/view/9>.
- Chantara, S., Thepnuan, D., Wiriya, W., & Prawan, S. (2019). Chemosphere Emissions of pollutant gases, fine particulate matters and their significant tracers from biomass burning in an open-system combustion chamber. *Chemosphere*, 224, 407–416. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.153>
- Cheah, W. Y., Sankaran, R., Show, P. L., Ibrahim, T. N. B. T., Chew, K. W., Culaba, A., & Chang, J. S. (2020). Pretreatment methods for lignocellulosic biofuels production: Current advances, challenges and future prospects. *Biofuel Research Journal*, 7(1), 1115–1127.

<https://doi.org/10.18331/BRJ2020.7.1.4>

- Congsomjit, D., & Areeprasert, C. (2021). Hydrochar-derived activated carbon from sugar cane bagasse employing hydrothermal carbonization and steam activation for syrup decolorization. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *11*(6), 2569–2584. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00635-y>
- Constitución de la Republica del Ecuador. (2008). *Constitucion de la República del Ecuador* (Vol. 53, Issue 9). Recuperado de [https://www.oas.org/juridico/pdfs/mesicic4\\_ecu\\_const.pdf](https://www.oas.org/juridico/pdfs/mesicic4_ecu_const.pdf).
- Cotes, A., Colque, C., Curutchet, A., & Zúñiga, D. (2022). *Reunión Nacional de biotecnología*. [https://doi.org/http://ciabcbbba.org/static/transacciones/images/historical/MEMORIA\\_REDBIO\\_2022.pdf#page=178](https://doi.org/http://ciabcbbba.org/static/transacciones/images/historical/MEMORIA_REDBIO_2022.pdf#page=178)
- Cruz, Y., Cadena, C., & Arango, J. (2019). Procesamiento de la Cascarilla de Cebada Cervecera por Vía Enzimática para la Obtención de Azúcares Fermentables. *Información Tecnológica*, *30*(4), 41–50. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642019000400041>
- Devi, A., Bajar, S., Kour, H., Kothari, R., Pant, D., & Singh, A. (2022). Lignocellulosic Biomass Valorization for Bioethanol Production : a Circular Bioeconomy Approach. *BioEnergy Research*. <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10401-9>
- Díaz, K., Casanova, M., León, C., & Gil, L. (2019). *Production of Pleurotus ostreatus ( Pleurotaceae ) ICFC 153 / 99 grown on different waste lignocellulosic*. *26*(3), 1177–1184. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2413-32992019000300022&lang=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2413-32992019000300022&lang=es)
- Domínguez, M., Alvarez, A., Castrejón, T., Granados, M., Hernández, F., Alcalá, V., & Tapia, J. (2015). Estudio de la cinética de la hidrólisis ácida de bagazo de caña de azúcar sin pretratamiento para la obtención de azúcares reductores. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, *12*(3), 153-159 Recuperado de <http://www.ehu.eus/reviberpo>.
- Donado, T. (2014). *Evaluación del sustrato para la producción del Hongo Ostra( Pleorotus Ostreatus)* (Vol. 2014, Issue June) [Universidad Rafael Landívar es la universidad Católica privada de Guatemala,]. <https://doi.org/10.1038/132817a0>
- Dos, A. C., Ximenes, E., Kim, Y., & Ladisch, M. R. (2019). Lignin–Enzyme Interactions in the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. *Trends in Biotechnology*, *37*(5), 518–531. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.010>
- Fajardo, E., Villegas, O., Andrade, M., Sotelo, H., Perdomo, F., & Viveros, J. L. (2022). *Mineral nutrition of chilhuacle in three phenological stages*. *13*(1), 155–165. <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v13n1/2007-0934-remexca-13-01-155-en.pdf>



- FAO. (2018). *Implicaciones del comercio internacional de bioetanol de caña para la seguridad alimentaria en Centroamérica: Oportunidades y retos ante el Acuerdo de Asociación con la Unión Europea*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-as130s.pdf>.
- Fernández, N., Gaggino, R., Kreiker, J., & Positieri, M. J. (2019). Desarrollo Tecnológico de Paneles Multicapa a partir de Residuos Lignocelulósicos Bioligados con Micelio de Hongos. *Ajea*, 4. <https://doi.org/10.33414/ajea.4.370.2019>
- Filippi, M. V., Cayolo, F., Maldonado, J. F., Martínez, D. A., & Belén Buglione, M. (2019). *Control De Contaminantes Durante El Proceso De Producción De Hongos Comestibles*. 1–9. [https://rid.unrn.edu.ar/bitstream/20.500.12049/5018/1/Trabajo completo Filippi et al.pdf](https://rid.unrn.edu.ar/bitstream/20.500.12049/5018/1/Trabajo%20completo%20Filippi%20et%20al.pdf)
- García, A., Cendales, E., & Eslava, A. (2016). Motores de combustión interna (MCI) operando con mezclas de etanol gasolina: revisión. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 26(1), 75. <https://doi.org/10.18359/rcin.1626>
- García, García, M. I., Vejar, G., Meza, L., & Chávez, J. (2020). Macromorphology and radial growth of entomopathogenic fungi strains suplement with lepidoteran powder. *Revista Colombiana de Entomología*, 46(1), 1–6. <https://doi.org/10.25100/SOCOLEN.V46I1.10164>
- García, Ramos, Á., Rubalcava, I., Caratachea, I. L., & Flores, A. (2021). Adición de alfalfa deshidratada como suplemento nutricional de los sustratos paja de avena y rastrojo de maíz en la producción de *Pleurotus ostreatus*. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente*, 21 numero, 77–86. <https://sociedadesruralesojs.xoc.uam.mx/index.php/srpma/article/view/356/351>
- Garzón, J., & Cuervo, J. (2015). Producción de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia. *Nova*, 6(10), 126-140 Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar>.
- Gobierno Municipal de Antonio Ante. (2017). Parroquias Antonio Ante. In *G. A. M. Municipal*. Recuperado de <https://www.antonioante.gob.ec/AntonioAnte/index.php/canton/parroquias>.
- Gómez, E., Ríos, L., & Peña, J. (2015). Efecto del Pretratamiento de Biomasa Maderera en el Rendimiento a Etanol. *Informacion Tecnologica*, 24(5), 113–122. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000500013>
- Gonzales, C., & Sierra, R. (2018). *Estudio de la actividad enzimática de Pleurotus ostreatus EN LA DESLIGNIFICACIÓN DE CASCARILLA DE ARROZ EN CULTIVO SEMISÓLIDO*. (tesis de pregrado). Universidad de los Andes, Bogota, Colombia.

- Grover, R., Goel, A., Wati, L., & Raj, K. (2015). Ethanol production from spent oyster mushroom substrate. *Pollution Research*, 34(1), 121-124 Recuperado de <https://www.researchgate.net>.
- Hernandez, C. (2017). “*Obtención De Bioetanol a Partir De Hidrolizados De Residuos De Fruta.*” (Tesis de maestria).Universidad de oviedo,Oviedo, España.
- Holgado, M. E., Carrasco, R. L. A., Lovaton, R. L., & Peláez, A. Q. (2019). *CCultivo de pleurotus sp . y lentinula edodes bajo condiciones Perú cultivation of pleurotus sp . and lentinula edodes under artisanal conditions in rural communities of the cusco region / Perú.* 18(2). <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v18n2/a03v18n2.pdf>
- INIAP. (2017). *Maíz suave.* Recuperado de <http://www.tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mcereal/rmaizs>.
- Instituto de Investigación Geológico y Energético [IIGE]. (2021). Balance Energetico Nacional. In *Ministerio de Energía y Recursos Naturales No Renovables.* [www.recursoyenergia.gob.ec](http://www.recursoyenergia.gob.ec)
- Jimenez, A. (2018). *Proceso de producción de bioetanol, a partir de la biomasa hidrolizada de la eichhornia crassipes con la levadura (saccharomyces cerevisiae)* (Issue 3). (Tesis de pregrado),Fundación Universitaria los Libertadores, Bogota, Colombia.
- Jiménez, B., Lucas, S., & Coca, M. (2017). *Obtención de bioetanol a partir de paja de Trigo: Estudio experimental y escalado a planta piloto.* (Tesis maestria). Universidad de Valladolid, Valladolid, España.
- Jiménez, Venegas, J., Jiménez, D., & Rivera, J. (2018). Hidrólisis ácida de cladodios de nopal para la obtención de azúcares fermentables. *CONAMTI*, [http://200.79.179.163/conamti/descargas/2018/23\\_Jimenez\\_et\\_al\\_2018a.pdf](http://200.79.179.163/conamti/descargas/2018/23_Jimenez_et_al_2018a.pdf), 101–105.
- Kim, H., Park, J., Choi, I., Wi, S., Ha, S., Chun, H., Hwang, I., Chang, J., Choi, H., Kim, J., & Woong, H. (2018). Effective approach to organic acid production from agricultural kimchi cabbage waste and its potential application. *Library of Science*, 1–14. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0207801>
- Luna, A., & Fachin, C. (2014). *Determinación del potencial de residuos sólidos de gallina de postura, ganado vacuno y porcino, en la provincia de coronel Portillo y Padre Abad, región Ucayali;2014.* (Tesis de pregrado )Universidad Nacional de Uvayali, Pucallpa-Perú.
- Matsuda, H., & Takeuchi, K. (2018). *Approach to Biofuel Issues from the Perspective of Sustainability Science Studies.* [https://doi.org/10.1007/978-4-431-54895-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-4-431-54895-9_2)
- Melgarejo, K., Urquizo, A., & Castro, A. (2019). *Influencia de la temperatura y concentración*

- de ácido sulfúrico en la hidrólisis ácida de raquis del baanano, variedad Musa cavendish, para la obtención de bioetanol por saccharomyces cerevisiae ATCC 4126.* (Tesis de pregrado). Univeridad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú.
- Montañez, J., Victoria, J., Flores, R., & Vivar, M. (2014). Fermentación de los fructanos del Agave tequilana Weber Azul por Zymomonas mobilis y Saccharomyces cerevisiae en la producción de bioetanol. *Informacion Tecnologica*, 22(6), 3-14 Recuperado de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/i>. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642011000600002>
- Montiel, K., & Romero, L. (2015). *Obtención de bioetanol a partir de la Coronta (Orote) del maíz variedad Hs-5, por el método de Hidrólisis Ácida diluida - Fermentación separada, Laboratorios de química.* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua, Nicaragua.
- Morales, & Campos, J. (2015). *Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos* [(tesis de doctorado) Universidad Autonoma de Madrid, Madrid, España.]. [http://digital.csic.es/bitstream/10261/132717/1/morales\\_de\\_la\\_rosa\\_silvia.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/132717/1/morales_de_la_rosa_silvia.pdf)
- Morales, J., Aguilar, M., Bolaños, E., & López, L. (2021). Optimization of Chemical Pretreatments Using Response Surface Methodology for Second-Generation Ethanol Production from Coffee Husk Waste. *Bioenergy Research*, 14(3), 815–827. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10197-6>
- Mulero, M., Postgrado, E. I. De, Molina-heredia, F. P., Roncel, M., & Sevilla, U. De. (2017). *Hongos entomopatógenos: de la agricultura a la conservación del patrimonio histórico.* 352–367. [https://academica-e.unavarra.es/bitstream/handle/2454/40891/ARTREV6508265\\_Crespo\\_HongosEntomopatogenos.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://academica-e.unavarra.es/bitstream/handle/2454/40891/ARTREV6508265_Crespo_HongosEntomopatogenos.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Naresh, M., Ravikumar, R., Thenmozhi, S., Ranjith, M., & Kirupa, M. (2019). Choice of Pretreatment Technology for Sustainable Production of Bioethanol from Lignocellulosic Biomass: Bottle Necks and Recommendations. *Waste and Biomass Valorization*, 10(6), 1693–1709. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0177-6>
- OCDE-FAO. (2017). *Biocombustibles situación del mercado Aspectos relevantes de la proyección.*
- OCDE/FAO. (2020). *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2020-2029.* [https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/ocde-fao-perspectivas-agricolas-2020-2029\\_a0848ac0-es](https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/ocde-fao-perspectivas-agricolas-2020-2029_a0848ac0-es)
- Oliva, J., & Ballesteros, M. (2015). *Efectos de los productos de degradacion originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre Kluyveromyces marxianus* (Issue January 2003) [(Tesis doctoral), Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.].

[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00220-5.L](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00220-5.L)

- Peña, K., Márquez, L., & Buenrostro, O. (2016). “ *Caracterización y biodegradación de los residuos lignocelulósicos domésticos* ” [Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
- PREFECTURA DE IMBABURA. (2017). *Plan Provincial de Riego y drenaje de Imbabura 2017- 2037*. Recuperado de [http://www.imbabura.gob.ec/phocadownload/K-Planes-programas/PLAN PROVINCIAL DE RIEGO Y DRENAJE DE IMBABURA 2017-2037.pdf](http://www.imbabura.gob.ec/phocadownload/K-Planes-programas/PLAN_PROVINCIAL_DE_RIEGO_Y_DRENAJE_DE_IMBABURA_2017-2037.pdf).
- Puccio, H. , & Simeoni, A. (2015). Hidrólisis ácida de la celulosa: magnitud del problema, solución y extensión de la vida útil del papel. *IV Congreso Iberoamericano y XII Jornada de Técnicas de Reparación y Conservación Del Patrimonio, Figura 1*, 87–94. <https://digital.cic.gba.gob.ar/handle/11746/1367>
- Purata, P., Cruz, A., Domínguez, S., & Del Angel, M. (2018). *Revista de Simulación y Laboratorio Obtención de jarabes glucosados por hidrólisis ácida de yuca ( Manihot esculenta ) Obtaining glucosados syrups by acid hydrolysis of cassava ( Manihot esculenta ) Revista de Simulación y Laboratorio. 5(16), 14–19.* [http://www.ecorfan.org/bolivia/researchjournals/Simulacion\\_y\\_Laboratorio/vol5num16/Revista\\_de\\_Simulacion\\_y\\_Laboratorio\\_V5\\_N16\\_4.pdf](http://www.ecorfan.org/bolivia/researchjournals/Simulacion_y_Laboratorio/vol5num16/Revista_de_Simulacion_y_Laboratorio_V5_N16_4.pdf)
- Ramady, H., Abdalla, N., Fawzy, Z., Badgar, K., Llanaj, X., Törös, G., Hajdú, P., Eid, Y., & Prokisch, J. (2022). Green Biotechnology of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus* L.): A Sustainable Strategy for Myco-Remediation and Bio-Fermentation. *Sustainability (Switzerland)*, *14*(6). <https://doi.org/10.3390/su14063667>
- Rezania, S., Oryani, B., Cho, J., Talaiekhozani, A., Sabbagh, F., Hashemi, B., Rupani, P. F., & Mohammadi, A. A. (2020). Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview. *Energy*, *199*, 117457. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117457>
- Robles, R. T., Nayeli, M., López, C., & Anell, A. (2018). Obtención de bioetanol a partir de pasto kikuyo ( *Pennisetum clandestinum* ). *Iberoamericana de Ciencias*. <http://www.reibci.org/publicados/2018/jun/2700107.pdf>
- Rogel, K., & Ayala, J. (2017). *Cuantificación de glucosa producida en el hidrolizado enzimático de la biomasa lignocelulósica (cáscara de arroz)*. (Tesis de pregrado).Universidad de Técnica de Machala, Machala, Ecuador.
- Romero, H., Macías Balón, C., Palacios Moreno, A., & Redrovan Pesantez, F. (2019). Estudio cinético de la producción de bioetanol a partir de residuos agroindustriales de la cáscara

- de banano maduro. *Industrial Data*, 22(1), 187–202.  
<https://doi.org/10.15381/idata.v22i1.16534>
- Ronquillo, M., & Niño, Z. (2018). *Obtención de bioetanol mediante hidrólisis enzimática a partir de biomasa residual agrícola procedente de maíz blanco, trigo y cebada con fines de biorefinería*. (Tesis de maestría), Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Chimborazo, Ecuador.
- Ruby, R., Carlos, M., & Morales, S. (2015). *Evaluación de residuos agrícolas como sustrato para la producción de Pleurotus ostreatus*. 2(37), 89-100 Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/>.
- Santana, U., Quiroz, O., Granados, B., & Quinto, A. (2017). Efectos en la cristalinidad del bagazo de caña de azúcar ( *Saccharum spp.*) por pretratamientos químicos usando dispersión de rayos X en ángulo amplio (wax). *AGROProductividad*, 10, 67–72.  
[https://doi.org/http://link.galegroup.com/apps/doc/A534487691/GPS?u=utn\\_cons&sid=GPS&xid=6292b846](https://doi.org/http://link.galegroup.com/apps/doc/A534487691/GPS?u=utn_cons&sid=GPS&xid=6292b846)
- Sardar, H., Ali, M., Ayyub, C., & Rashid, A. (2015). *Effects of different culture media , temperature and ph levels on the growth of wild and exotic pleurotus species*. 27(02), 139–145.  
[https://www.researchgate.net/publication/311456357\\_Pakistan\\_Journal\\_of\\_Phytopathology\\_EFFECTS\\_OF\\_DIFFERENT\\_CULTURE\\_MEDIA\\_TEMPERATURE\\_AND\\_pH\\_LEVELS\\_ON\\_THE\\_GROWTH\\_OF\\_WILD\\_AND\\_EXOTIC\\_PLEUROTUS\\_SPECIES\\_A\\_B\\_S\\_T\\_R\\_A\\_C\\_T](https://www.researchgate.net/publication/311456357_Pakistan_Journal_of_Phytopathology_EFFECTS_OF_DIFFERENT_CULTURE_MEDIA_TEMPERATURE_AND_pH_LEVELS_ON_THE_GROWTH_OF_WILD_AND_EXOTIC_PLEUROTUS_SPECIES_A_B_S_T_R_A_C_T)
- Shirvani, S., Shirvani, S., Shamekhi, A. H., & Reitz, R. D. (2020). A study of using E10 and E85 under direct dual fuel stratification (DDFS) strategy: Exploring the effects of the reactivity-stratification and diffusion-limited injection on emissions and performance in an E10/diesel DDFS engine. *Fuel*, 275(December 2019), 117870.  
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117870>
- SIPA. (2021). *Cifras agroproductivas*. Recuperado de <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/cifras-agroproductivas>.
- Suárez, C., Garrido, N. A., & Guevara, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 50(1), 20–28. <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223148420004.pdf>
- Tinoco, J., & Sánchez, F (2022) evaluación de la desinfección y eficiencia de sustrato para la producción del hongo ostra rosado (*pleurotus djamor b*) con residuos agro forestales en san José de Chaltura (Tesis de pregrado), Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador.

- Trujillo, L. E., Chávez - Urbiola, E. A., Legorreta, F., Escamilla - Casas, J. C., & M. L., E. (2018). Efectos del pH sobre la síntesis de di-tiourea cloruro de cadmio. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías Del ICBI*, 6(11), 16–19. <https://doi.org/10.29057/icbi.v6i11.3033>
- Tudge, S. J., Purvis, A., & De Palma, A. (2021). The impacts of biofuel crops on local biodiversity: a global synthesis. *Biodiversity and Conservation*, 30(11), 2863–2883. <https://doi.org/10.1007/s10531-021-02232-5>
- Valdés, A., & Morales, R. (2017). Obtención de bioetanol a partir de tallos de quínoa (*Chenopodium quinoa*) utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. In *Universidad Tecnológica Equinoccial* (Vol. 1). (Tesis de pregrado), Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito, Ecuador.
- Vargas, P., & Lopez, I. (2019). *Diseño de un modelo de producción de chirimoya en el municipio de Contenido*. (Tesis de Pregrado), Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá, Colombia.
- Varnero, M., Quiroz, M., & Álvarez, C. (2015). Utilización de residuos forestales lignocelulósicos para producción del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*). *Informacion Tecnologica*, 21(2), 13–20. <https://doi.org/10.1612/inf.tecnol.4154it.09>
- Vasić, K., Knez, Ž., & Leitgeb, M. (2021). Bioethanol production by enzymatic hydrolysis from different lignocellulosic sources. *Molecules*, 26(3). <https://doi.org/10.3390/molecules26030753>
- Vásquez, P. (2017). *Determinación del ph óptimo para la actividad enzimática de levadura panadera durante el proceso de fermentación*. 14. [https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/62969897/Elkin\\_Paul\\_Vasquez\\_Oblitas-\\_Biologia20200415-17851-ovva20-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1665526806&Signature=WYSzeEq6JXzOkPefWNEom8bMIMzAzlZKkYyEBcruFBU8P9708tbJTaOpqrw2asFRroOL2jXv1dJrLNCdwJRjGifQRd2UqZfPq9](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/62969897/Elkin_Paul_Vasquez_Oblitas-_Biologia20200415-17851-ovva20-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1665526806&Signature=WYSzeEq6JXzOkPefWNEom8bMIMzAzlZKkYyEBcruFBU8P9708tbJTaOpqrw2asFRroOL2jXv1dJrLNCdwJRjGifQRd2UqZfPq9)
- Vazquez. (2016). *Obtención de etanol grado industrial a partir del mucílago de café (Coffea arabica sp)*. Tesis de pregrado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Cintalapa, México Montevideo, Uruguay.
- Velázquez, J., Salinas, J., Potter, M., Gallardo, M., Caballero, F., & Díaz, P. (2017). *Cantidad, cobertura y descomposicion de residuos de maiz sobre el suelo*. 20, 171–182. <https://www.redalyc.org/pdf/573/57320210.pdf>
- Vilca, G. (2022). *Efecto de la temperatura y tipo de levadura comercial ( saccharomyces cerevisiae ) para la producción de alcohol en la fermentación del fruto de la granada (*

*Punica Granatum* ) ”. (Tesis de pregrado), Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Arequipa, Perú.

Villar, L. (2021). Sustratos provenientes de residuos agrícolas en la producción del hongo comestible *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedijn EN TINGO MARÍA. In Facultad De Zootecnia. In *Facultad De Zootecnia*. (Tesis de pregrado), Universidad Naional Agraria de la Selva, Tingo María, Perú.

Virreira, J., Góngora, O., & Souza, R. (2014). *Caracterización fisicoquímica de las cascaras de naranja (Citrus sinensis L.) y pomelo (Citrus grandis), para obtener bioetanol*. (Tesis de pregrado) Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquitos, Perú.

## ANEXO A

### Recolección de los sustratos y la preparación

#### Materia prima

- Residuos de maíz San Roque 15 (kg)
- Residuos de maíz Natabuela 15 (kg)
- Residuos de maíz Imbaya 15 (kg)

#### Materiales

- Costales 3
- Marcadores 1
- Fundas plásticas 3
- Cuchillo de sierra 1
- Pulverizador 1
- GPS 1

#### Procedimiento

- Se procedió a la recolección de los sustratos de los tres sitios, y mediante el instrumento GPS se tomó las coordenadas y la altitud.
- Las muestras se secaron en el sol, y se recortó en diámetros aproximadamente de 3 a 4 cm con un cuchillo y guardadas en fundas con las respectivas designaciones de letras.
- Dentro de los laboratorios de la BINAM se procede a colocar toda la implementación como son las orejeras y una máscara facial para utilizar el pulverizador.
- Se trituro en la maquina marca (Fritsch Pulverisette), utilizando una malla de 2 cm e identificando todos los sustratos e identificados.



Recolección de los sustratos



Triturado el material a 1cm



Material identificado

#### Preparación del sustrato



## ANEXO B

### Protocolo de la elaboración del medio PDA

Método para la conservación de especies de hongos para tres cajas.

#### Reactivos

- PDA 2,34 g
- Agua destilada 60ml

#### Equipos

- Balanza analítica
- Bandejas de polietileno
- Agitador magnético con calentador
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Mechero
- Cajas petri 3 (20ml)
- Papel craft
- Probeta
- Frasco boeco

#### Procedimiento

- Se usaron 3 cajas petri, se envolvieron con papel craft y se llevó a autoclave por 45 minutos.
- Se procedió a pesar en bandejas de polietileno, con una balanza de precisión analítica 2.34 (g) de PDA.
- Se midió en una probeta 60(ml) de agua destilada, se mezcló en un frasco boeco agua y la sustancia PDA y luego se calentó el medio en un agitador magnético y se llevó a la autoclave.
- Se vertió el medio en las cajas dentro de la cámara de flujo laminar hasta solidificarse, este medio puede ser utilizado después de la solidificación o guardado en refrigeración hasta que sea utilizado.



Preparación del material



Pesar la sustancia PDA



Calentar el medio

Preparación del Medio PDA

## ANEXO C

Preparación del sustrato se utilizó 200g por cada sitio en la inoculación del Hongo *Pleorotus ostreatus* y de similar manera para el resto de muestras realizando los respectivos cálculos.

### Materia o sustancias

• Sustratos de maíz San Roque	200 (g)	• Agua destilada	1800 (ml)
• Sustratos de maíz Natabuela	200 (g)	• Cal	12 (g)
• Sustrato de maíz Imbaya	200 (g)	• Yeso	12 (g)
• Micelio del hongo <i>Pleorotus</i>	120 (g)		

### Materiales

• Fundas plásticas	12	• Bandeja de aluminio	3
• Autoclave de olla	1	• Mechero	1
• Cámara de flujo laminar	1	• Marcador	1
• Cinta adhesiva	1	• Balanza	1

### Procedimiento

- Se procedió a pesar 200g de cada sustrato colocando en diferentes bandejas.
- En una probeta se toma 600ml de agua destilada se colocará 4 (g) de cal y 4 (g) de yeso y se disuelve, humedecemos el sustrato obteniendo 800 (g) total.
- Los 800 (g) se procede a colocar en diferentes fundas con un peso de 200 (g) obteniendo cuatro fundas y designándoles las respectivas letras y sellando con cinta adhesiva.
- Llevar a la olla de autoclave después de que la presión llegara a 15 psi se mantendrá durante una hora para eliminar los microorganismos presentes en el sustrato.



Humectación del sustrato



Olla de autoclave



Material auto clavado

Preparación del Material para la inoculación de *Pleorotus ostreatus*

## ANEXO D

Hidrolisis Ácida es un proceso que se indica para 24 muestra y se llevó el mismo proceso para el resto.

### Materia prima o sustancias

Material delignificado	18(g)
Agua destilada	162(ml)
Ácido sulfúrico al 10% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	78(ml)

### Materiales

Tubos falcón de 50 (ml)	24
Probetas 100 10 (ml)	2
Balanza electrónica	1
Tubos falcón de 25 (ml)	24
Papel filtro 4 cm <sup>2</sup>	24
Embudos de vidrio	4
Cernidor	4
Olla de autoclave	1
Membretes	24
Frascos de vidrio 3(l)	2

Nomenclatura utilizada en el proceso de hidrólisis ácida como se muestra en el diagrama de hidrólisis ácida.

MDS= Muestra delignificada San Roque

MDN= Muestra delignificada Natabuela

MDI= Muestra delignificada Imbaya

t1= Tiempo de hidrólisis ácida 1 (15 min)

t2= Tiempo de hidrólisis ácida 2 (30 min)

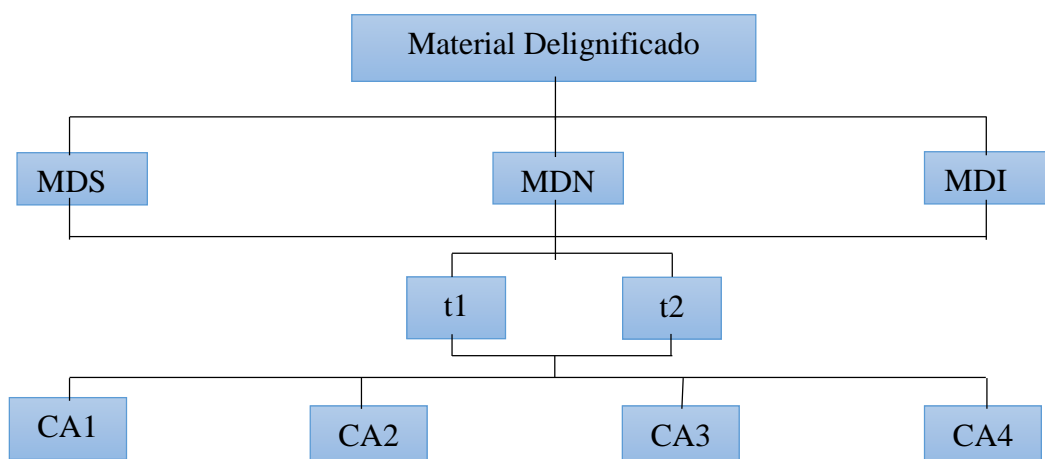
CA1= Concentración de ácido 1 (1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

CA2= Concentración de ácido 2 (2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

CA3= Concentración de ácido 3 (4% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

CA4= Concentración de ácido 4 (6% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

## Diagrama de Hidrólisis Ácida



Nota. La nomenclatura utilizada esta descrita anteriormente

### Procedimiento

- Se etiqueta con los membretes los tubos con las siguientes variables tiempo y la relación sólida: liquido.
- Se procedió a pesar un gramo de sustrato delignificado, y se coloca en un tubo falcón y de similar manera para los 23 tubos.
- Hacemos diluciones al tener ácido sulfúrico al 10%  $H_2SO_4$  realizando los cálculos con la siguiente formula  $c_1V_1 = c_2V_2$ , para esto se utilizará tres probetas la primera para medir el agua la segunda el  $H_2SO_4$ , la tercera nos permitirá mesclar teniendo un volumen de 60 (ml) que será distribuido 10ml en cada tubo, este proceso para las diferentes concentraciones como muestra la siguiente tabla 22

**Tabla 23**  
*Diluciones de Ácido Sulfúrico*

$c_1V_1 = c_2V_2$ Concentración (%)	Una muestra		Seis muestras	
	H <sub>2</sub> O (ml)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)	H <sub>2</sub> O (ml)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)
1	9	1	54	6
2	8	2	48	12
4	6	4	36	24
6	4	6	24	36

- d) Colamos los tubos en los envases de vidrio y los llevamos a la olla de autoclave hasta llegar a una presión de 15 psi y a una temperatura de 121°C hasta un tiempo de 15 minutos, y de similar manera a 30 minutos.
- e) Filtro con la utilización del cernidor y papel filtro y se extrajo el sobrenadante para guardarlos en tubos falcón de 25 (ml).



Tubos falcón en la olla de autoclave



Tubos falcón auto clavados



Filtración del liquido

### Hidrólisis Ácida

## ANEXO E

Protocolo del DNS esta explicado para 25 muestras y de igual manera para el resto.

### Reactivos

- DNS 6250  $\mu$ l
- Agua destilada 220 ml
- Liquido filtrado 24 (u)

### Equipos

Micropipeta de 1000 (ml)	1	Cubetas para espectrofotometría	25
Puntas	52	Espectrofotómetro	1
Tubos de 5(ml)	25	Aluminio (2.5) cm <sup>2</sup>	25

### Procedimiento

- Se manipuló el filtrado de las muestras anteriores realizadas, con una micropipeta calibrada a 250  $\mu$ l con la respectiva punta para cada uno, vertimos en los tubos e igualmente ponemos agua en un tubo.
- En todos los tubos colocamos el reactivo DNS 250  $\mu$ l y se procede a colocar en cada uno, cubrimos con papel aluminio los tubos.
- Para la activación del DNS se procedió a calentar el agua hasta 100°C, se sumergieron las muestras por 10 minutos y se extraen después determinado tiempo.
- Añadimos 2000  $\mu$ l de agua destilada, tomamos con la micropipeta colocamos en cada uno de ellos, mezclamos.
- Tomamos con la micropipeta de 1000  $\mu$ l de las muestras con su respectiva punta y colocamos en cada cubeta de espectrofotómetro.
- Se procede a utilizar el espectrofotómetro configurando la longitud de onda a 540, y se utilizara el blanco para calibrar la curva y se procedió a realizar las siguientes mediciones.



Material para DNS



Calentar el medio



Utilización de las cubetas

DNS

- Análisis de la hidrólisis ácida mediante el programa InfoStat

## Resultados de la Hidrólisis para San Roque

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
mg/ml	24	0,95	0,94	16,13

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5,74	4	1,43	97,98	<0,0001
Concentración ( %)	5,32	3	1,77	121,05	<0,0001
Tiempo (min)	0,42	1	0,42	28,75	<0,0001
Error	0,28	19	0,01		
Total	6,02	23			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,14624

Error: 0,0146 gl: 19

Concentración ( %)	Medias	n	E.E.	
6	0,13	6	0,05	A
4	0,58	6	0,05	B
2	0,87	6	0,05	C
1	1,43	6	0,05	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,10340

Error: 0,0146 gl: 19

Tiempo (min)	Medias	n	E.E.	
St2	0,62	12	0,03	A
St1	0,88	12	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

## Análisis mediante test: LSD Fisher para Natabuela

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
mg/ml	24	0,92	0,90	19,83

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,86	4	0,96	51,18	<0,0001
Concentración ( %)	3,26	3	1,09	57,69	<0,0001
Tiempo (min)	0,60	1	0,60	31,67	<0,0001
Error	0,36	19	0,02		
Total	4,22	23			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,16589

Error: 0,0188 gl: 19

Concentración ( %)	Medias	n	E.E.	
6	0,27	6	0,06	A
4	0,45	6	0,06	B
2	0,82	6	0,06	C
1	1,23	6	0,06	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,11730

Error: 0,0188 gl: 19

Tiempo (min)	Medias	n	E.E.	
St2	0,53	12	0,04	A
St1	0,85	12	0,04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

*Análisis Mediante Test: LSD Fisher para Imbaya*

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
mg/ml	24	0,92	0,91	20,98

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,21	4	0,80	57,19	<0,0001
Concentración ( %)	2,39	3	0,80	56,84	<0,0001
Tiempo (min)	0,82	1	0,82	58,24	<0,0001
Error	0,27	19	0,01		
Total	3,48	23			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,14318

Error: 0,0140 gl: 19

Concentración ( %)	Medias	n	E.E.	
6	0,19	6	0,05	A
4	0,40	6	0,05	B
2	0,62	6	0,05	C
1	1,04	6	0,05	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,10125

Error: 0,0140 gl: 19

Tiempo (min)	Medias	n	E.E.	
St2	0,38	12	0,03	A
St1	0,75	12	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)



## ANEXO F

Fermentación se dará a conocer para tres muestras y de similar manera para los 24 restantes.

### Reactivos

- Agua destilada 6 ml
- Líquido hidrolizado 150 ml

### Equipos

- Matraces 120 ml 3
- Mangueras 3
- Tapones 3
- Tubos de 5(ml) 5
- Incubadora con agitación orbital 1
- Alcohol al 90% 6 (ml)

### Procedimiento

- a) El líquido guardado en los tubos falcón de 50ml y regulado el pH se vertió en el matraz.
- b) Coloco 10 ml de levadura activada en el matraz, además, utilizamos un tapón que presenta un orificio en el centro para la colocación de la manguera y la eliminación de CO<sub>2</sub> en producto de la fermentación, de agua destilada con alcohol.
- c) Situamos el matraz en la incubadora con agitación orbital a una temperatura de 30°C y a 200 rpm por ocho días.
- d) Pasado ese tiempo se procede a utilizar el equipo de destilación para la obtención de bioetanol siempre manteniendo la tempera a 78°C.
- e) La obtención de bioetanol se pesó el tubo y se procedió a rotular los tubos eppendorf con las variables del lugar, y el pH.
- f) El bioetanol se recolecto en los tubos y finalmente se pesó para obtener la cantidad de bioetanol por 5 gramos de muestra.



Reactores



Incubadora a 30°C



Destilación

a) Proceso de fermentación y destilació

- g) Evaluación de rendimiento de bioetanol mediante el programa infostat con respecto al Ph mediante la prueba de Friedman

Prueba de Friedman

ph3	ph4	ph5	T <sup>2</sup>	p
1,00	2,00	3,00	1E30	<0,0001

Minima diferencia significativa entre suma de rangos = 0,000

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	n	
ph3	3,00	1,00	3	A
ph4	6,00	2,00	3	B
ph5	9,00	3,00	3	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,050)

- h) Evaluación de rendimiento de bioetanol mediante el programa infostat con respecto a los lugares LSD Fisher

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,09092

Error: 0,0016 gl: 4

Bloque	Medias	n	E.E.	
I	0,72	3	0,02	A
N	0,73	3	0,02	A
S	0,86	3	0,02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)