

**Universidad Católica de Santa María**  
**Facultad de Arquitectura e Ingenierías Civil y del Ambiente**  
**Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental**



**Evaluación del rendimiento de un sistema de obtención de bioetanol a partir  
de la biomasa de jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*)**

Tesis presentada por las Bachilleres:

**Lazaro Mamani, Alejandra Yadhira**

**ORCID: 0009-0008-9949-5491**

**Paredes Cardenas, Gianella Noemi**

**ORCID: 0009-0008-3810-1452**

para optar el Título Profesional de Ingeniera Ambiental

Asesor (a):

**Mg. Benegas Llanos, Rosario Carolina**

**ORCID: 0000-0002-1728-4949**

Arequipa - Perú

2024

UCSM-ERP

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**

**INGENIERIA AMBIENTAL**

**TITULACIÓN CON TESIS**

**DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR**

Arequipa, 11 de Noviembre del 2024

**Dictamen: 007236-C-EPIA-2024**

Visto el borrador del expediente 007236, presentado por:

**2017802312 - PAREDES CARDENAS GIANELLA NOEMI**  
**2017200752 - LAZARO MAMANI ALEJANDRA YADHIRA**

Titulado:

**EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE UN SISTEMA DE OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE  
LA BIOMASA DE JACINTO DE AGUA (EICHHORNIA CRASSIPES)**

Nuestro dictamen es:

**APROBADO**

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

**INGENIERO AMBIENTAL**

**43297964 - CAMPOS OLAZAVAL LIZBETH MARIANELLA**  
**DICTAMINADOR**



**46769238 - CHANOVE MANRIQUE ANDREA MARIETA**  
**DICTAMINADOR**



**29519918 - BEJARANO MEZA MARIA ELIZABETH**  
**DICTAMINADOR**



# Evaluación del rendimiento de un sistema de obtención de bioetanol a partir de la biomasa de jacinto de agua (Eichhornia crassipes)

## INFORME DE ORIGINALIDAD

19%

INDICE DE SIMILITUD

18%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="https://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	2%
2	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	2%
3	<a href="https://repositorio.uta.edu.ec">repositorio.uta.edu.ec</a> Fuente de Internet	1%
4	<a href="https://es.scribd.com">es.scribd.com</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="https://repositorio.uncp.edu.pe">repositorio.uncp.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1%
6	<a href="https://dspace.ups.edu.ec">dspace.ups.edu.ec</a> Fuente de Internet	<1%
7	<a href="https://repository.usta.edu.co">repository.usta.edu.co</a> Fuente de Internet	<1%
8	<a href="https://repositorio.unal.edu.co">repositorio.unal.edu.co</a> Fuente de Internet	<1%

### *Dedicatoria*

*Quiero expresar mi gratitud a Dios y a mi familia, en especial a mis padres, Francisco y Mabel, por su amor incondicional, por ser mi fuente de motivación constante para seguir adelante y por brindarme valiosas lecciones de perseverancia. A mis hermanas, Dafne y Daniela, gracias por su cariño y por darme el aliento necesario para continuar persiguiendo mis sueños. Agradezco a Fernando, por su compañía, sus palabras de apoyo y por motivarme a siempre sacar siempre lo mejor de mí. A Alejandra, con quien llevé a cabo el presente trabajo de investigación, juntas enfrentamos retos y superamos obstáculos, gracias por tu constancia y las innumerables horas de trabajo que compartimos en el laboratorio, este trabajo es el reflejo de nuestro esfuerzo conjunto. A mis amigos del laboratorio E-406, quienes no solo me brindaron su apoyo en momentos difíciles durante el proceso experimental, sino que también me brindaron palabras de aliento. Finalmente, agradezco a las personas que contribuyeron a que este trabajo llegara a buen término. Gracias a cada uno de ustedes, su apoyo ha sido fundamental para alcanzar este logro.*

***Gianella Noemí Paredes Cárdenas***

*A mis padres, por comprometerse con mi futuro y pese a su cansancio en sus días de labor, dejarme su mayor legado que es mi profesión. A mi padre, Jorge y, mi abuelo Rómulo en el cielo, su espíritu y amor han sido la motivación de cada uno de mis logros. A mi fiel compañero canino Bruce, por acompañarme en todas mis noches de desvelo y nunca separarse de mí. A Gianella, el motor de esta investigación, quien brindó todo su esfuerzo y dedicación en la parte experimental para que logremos alcanzar el objetivo propuesto, y quién me enseñó que la verdadera amistad está en la corrección y en el impulso a ser mejor. Al Ing. José Villegas, por sus palabras y correcciones precisas, gracias por su guía y todos los consejos que llevaré grabados en la memoria a lo largo de mi carrera profesional. Y finalmente, a mi familia, docentes y amigos cercanos, por sus palabras motivacionales y su apoyo brindado en el momento más difícil de mi vida, lo que me animó a concluir con este largo y retador camino.*

***Alejandra Yadhira Lazaro Mamani***

## *Agradecimiento*



*Agradecemos a la Universidad Católica de Santa María, la cual, a través del Vicerrectorado de Investigación, nos brindó la oportunidad de poder acceder a los Fondos Internos para la Investigación en el año 2020. Así también, agradecemos a la Mg. Rosario Benegas Llanos por su apoyo en la gestión del proyecto y su comprensión y paciencia durante todo el proceso de elaboración del presente trabajo de investigación.*

## RESUMEN

Las macrófitas acuáticas vienen siendo consideradas como un problema medioambiental que trae consigo graves consecuencias debido a su rápida proliferación lo que afecta negativamente la biodiversidad acuática y la disponibilidad de agua para el bienestar de los seres humanos, los alimentos y la producción industrial. Sin embargo, muchos ignoran su composición química la cual resulta ser valiosa dado que su biomasa lignocelulósica ha demostrado tener un potencial prometedor como materia prima para la producción de bioetanol. En ese sentido, la presente investigación tiene como objetivo aprovechar la biomasa de Jacinto de Agua (*Eichhornia crassipes*) para la producción de bioetanol. Para ello, la biomasa seca fue sometida a un pretratamiento considerando un diseño experimental de Box Behnken con tres puntos centrales, el cual estimó el análisis de 45 ensayos en los que se sometió a la biomasa tamizada en 3 granulometrías (150, 200 y 250  $\mu\text{m}$ ) a tres concentraciones de NaOH (1%, 2% y 3%) y con intervalos de exposición a explosión de vapor con tiempos de 15, 30 y 45 minutos en autoclave. Asimismo, para conocer el cambio estructural en la biomasa pretratada, se realizaron análisis SEM y FTIR. Seguido a ello, se sometió a un proceso de hidrólisis con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 3% con explosión a vapor durante 30 minutos, la cuantificación de azúcares reductores se midió con el método DNS. El hidrolizado se inoculó con *Saccharomyces cerevisiae* en un sistema anaeróbico con agitación continua a 120 rpm con una temperatura de 30° C. Durante la fermentación se monitoreó los azúcares reductores, así como la concentración de bioetanol obtenida durante 72 horas. De acuerdo con los resultados del balance de materia, el rendimiento volumétrico de la concentración de azúcares reductores respecto a la concentración de bioetanol obtenida fue equivalente al 71.35% y con relación al rendimiento, en términos de biomasa inicial fue equivalente a 0.12 ml/g.

**Palabras claves:** *macrófitas, pretratamiento, bioetanol*

## ABSTRACT

Aquatic macrophytes are considered an environmental problem that brings with it serious consequences due to their rapid proliferation, which negatively affects aquatic biodiversity and the availability of water for human well-being, food and industrial production. However, many have ignored their chemical composition, which turns out to be very valuable since their lignocellulosic biomass has shown promising potential as a raw material for bioethanol production. In this sense, the present research aims to take advantage of the biomass of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) for bioethanol production. For this purpose, the dry biomass was subjected to a pretreatment considering a Box Behnken experimental design with three central points, which estimated the analysis of 45 tests in which the sieved biomass was subjected to 3 particle sizes (150, 200 and 250  $\mu\text{m}$ ) at three concentrations of NaOH (1%, 2% and 3%) and with intervals of exposure to steam explosion with times of 15, 30 and 45 minutes in an autoclave. Likewise, to know the structural change in the pretreated biomass, SEM and FTIR analyses were performed. Following this, it was subjected to a hydrolysis process with 3%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  with steam explosion for 30 minutes, the quantification of reducing sugars was measured with the DNS method. The hydrolysate was inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* in an anaerobic system with continuous stirring at 120 rpm and a temperature of 30° C. During fermentation, reducing sugars were monitored, as well as the bioethanol concentration obtained for 72 hours. According to the results of the material balance, the volumetric yield of the concentration of reducing sugars with respect to the concentration of bioethanol obtained was equivalent to 71.35% and in relation to the yield, in terms of initial biomass, it was equivalent to 0.12 ml/g.

**Keywords:** macrophytes, pretreatment, bioethanol

## ÍNDICE

**DEDICATORIA**

**AGRADECIMIENTO**

**RESUMEN**

**ABSTRACT**

**INTRODUCCIÓN** ..... 1

**CAPÍTULO I** ..... 2

**1. PLANTEAMIENTO TEÓRICO**..... 3

**1.1. Problemática de la Investigación**..... 3

**1.2. Justificación**..... 4

1.2.1. *Ambiental* ..... 4

1.2.2. *Económica* ..... 5

1.2.3. *Social* ..... 5

1.2.4. *Tecnocientífica* ..... 5

**1.3. Objetivos**..... 6

1.3.1. *Objetivo General* ..... 6

1.3.2. *Objetivos Específicos* ..... 6

**1.4. Hipótesis** ..... 6

**CAPÍTULO II**..... 7

**2. FUNDAMENTO TEÓRICO**..... 8

**2.1. Marco Legal** ..... 8

2.1.1. *Sobre Normativas Generales* ..... 8

2.1.2. *Sobre Bioetanol* ..... 8

**2.2. Antecedentes de la investigación** ..... 9

**2.3. Marco Teórico**..... 15

2.3.1. *Dependencia de los Combustibles Fósiles* ..... 15

2.3.2. *Alternativas Sostenibles de Producción de Energía* ..... 17

2.3.3. *Conversión de Biomasa Lignocelulósica a Bioetanol*..... 20

2.3.4. *Procesos para la transformación de la biomasa lignocelulósica a bioetanol* ..... 23

2.3.5. *Macrófitas* ..... 30

2.3.6. *Análisis de Varianza (ANOVA)*..... 32

2.3.7. *Modelo de Superficie de Respuesta*..... 32

**CAPÍTULO III** ..... 34

**3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**..... 35

<b>3.1. Tipo y nivel de investigación.....</b>	<b>35</b>
3.1.1. <i>Enfoque de la investigación</i> .....	35
3.1.2. <i>Tipo de investigación</i> .....	35
3.1.3. <i>Nivel de la investigación</i> .....	35
3.1.4. <i>Diseño de la investigación</i> .....	35
3.1.5. <i>Campo de investigación</i> .....	36
3.1.6. <i>Variables</i> .....	36
3.1.7. <i>Diseño experimental</i> .....	37
3.1.8. <i>Materiales y equipos</i> .....	39
<b>3.2. Métodos de Investigación.....</b>	<b>42</b>
3.2.1. <i>Determinación de lignina y humedad del Jacinto de Agua (Eichhornia crassipes)</i> .....	42
3.2.2. <i>Establecimiento de condiciones experimentales de pretratamiento alcalino</i> .....	45
3.2.3. <i>Obtención de azúcares reductores mediante hidrólisis ácida</i> .....	47
3.2.4. <i>Obtención de bioetanol a partir de la fermentación del hidrolizado</i> .....	48
3.2.5. <i>Determinación del rendimiento del bioetanol</i> .....	49
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>51</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1. Determinación de lignina y humedad del Jacinto de Agua (Eichhornia crassipes)</b>	<b>52</b>
<b>4.2. Establecimiento de condiciones experimentales de pretratamiento alcalino</b> .....	<b>54</b>
<b>4.3. Obtención de azúcares reductores mediante hidrólisis ácida</b> .....	<b>72</b>
<b>4.4. Obtención de bioetanol a partir de la fermentación del hidrolizado</b> .....	<b>76</b>
<b>4.5. Determinación del Rendimiento del bioetanol</b> .....	<b>84</b>
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>91</b>
<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>92</b>
<b>A. Conclusiones</b> .....	<b>92</b>
<b>B. Recomendaciones</b> .....	<b>94</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>95</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Operacionalización de Variables.....	36
<b>Tabla 2.</b> Matriz de diseño experimental.....	38
<b>Tabla 3.</b> Reactivos utilizados en la investigación.....	39
<b>Tabla 4.</b> Resultados de caracterización de lignina en la biomasa del jacinto de agua.....	53
<b>Tabla 5.</b> Concentración de azúcares reductores después de hidrólisis.....	55
<b>Tabla 6.</b> Análisis de Varianza ANNOVA.....	60
<b>Tabla 7.</b> Cuantificación de azúcares reductores posterior a la hidrólisis ácida diluida de la biomasa.....	72
<b>Tabla 8.</b> Concentración de azúcares reductores obtenidos a partir de plantas acuáticas.....	74
<b>Tabla 9.</b> Comportamiento de los azúcares reductores durante el proceso de fermentación.....	78
<b>Tabla 10.</b> Resultados de la concentración de etanol en el proceso de la fermentación.....	81
<b>Tabla 11.</b> Evaluación de concentración de bioetanol obtenido a partir de plantas acuáticas.....	82
<b>Tabla 12.</b> Comparación del rendimiento de etanol con diversas plantas acuáticas.....	84
<b>Tabla 13.</b> Costos de productos químicas una planta de producción de bioetanol.....	90

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Índices de producción de etanol en el mundo.....	17
<b>Figura 2.</b> Clasificación de bioetanol en base a la biomasa utilizada.....	20
<b>Figura 3.</b> Composición de la biomasa lignocelulósica.....	21
<b>Figura 4.</b> Ubicación de recolección de la plántula de <i>Eichhornia crassipes</i> .....	42
<b>Figura 5.</b> a. Imagen SEM sin pretratamiento, b. imagen SEM después del pretratamiento a condiciones de NaOH 1% y tiempo de pretratamiento de 30 minutos.....	58
<b>Figura 6.</b> Espectros infrarrojos por transformada de Fourier comparando biomasa de muestra con pretratamiento y sin pretratamiento.....	59
<b>Figura 7.</b> Gráfica de Superficie 3D y contorno de las variables Concentración de NaOH y Tiempo de pretratamiento.....	62
<b>Figura 8.</b> Gráfica de Superficie 3D y contorno de las variables Concentración de NaOH y Tamaño de partícula ..	63
<b>Figura 9.</b> Gráfica de Superficie 3D y contorno de las variables Tiempo de pretratamiento y Tamaño de partícula	63
<b>Figura 10.</b> Gráficas de interacción de variables durante el pretratamiento.....	67
<b>Figura 11.</b> Gráfica normal de los residuos.....	69
<b>Figura 12.</b> Gráfica de efectos principales.....	71
<b>Figura 13.</b> Concentración de azúcares reductores respecto al tiempo de fermentación.....	79
<b>Figura 14.</b> Evolución de la concentración de bioetanol durante el proceso de fermentación del Hidrolizado.....	81

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Certificado de identificación de la planta <i>Eichhornia crassipes</i> .....	126
<b>Anexo 2.</b> Porcentaje de humedad de las plantas analizadas.....	127
<b>Anexo 3.</b> Tabla de resultados de caracterización de la biomasa (Jacinto de agua).....	129
<b>Anexo 4.</b> Panel fotográfico de la experimentación.....	130
<b>Anexo 5.</b> Resultados de Caracterización por Microscopía Electrónica de Barrido.....	132

## INTRODUCCIÓN

El incremento de gases de combustión emitidos a la atmósfera por la alta demanda mundial de energía exhorta a proponer fuentes de energía alternativa como la bioenergía, que puede considerarse un actor potencial en el contexto de la energía renovable. Esta tendencia ha motivado a investigadores a buscar nuevas fuentes que puedan suministrar energía necesaria para el desarrollo socioeconómico y al mismo tiempo reducir las emisiones contaminantes. En ese sentido, los macrófitos acuáticos invasores han llamado la atención debido a su capacidad de proliferar rápidamente y producir mayores cantidades de biomasa a través del secuestro de nutrientes. La ventaja de este tipo de especies es que pueden crecer en sistemas hídricos sin competir con los cultivos por el uso de la tierra, presentan altos rendimientos de biomasa por área, no requieren costos de cultivo y pueden usarse para la fitorremediación de compuestos orgánicos peligrosos y metales pesados del agua contaminante. Ahora bien, el Jacinto de Agua (*Eichhornia crassipes*), es una macrófita flotante altamente productiva y efectiva considerada como maleza invasora que puede causar un daño perjudicial en los ecosistemas debido a su notoria propiedad de erradicar el oxígeno y los minerales disueltos en los cuerpos de agua, disminuir la tasa de biodiversidad y mejorar la tasa de evapotranspiración de los ecosistemas acuáticos, así también se ha reportado efectos negativos a la salud humana y la economía. Sin embargo, su composición es rica en nutrientes como la celulosa y hemicelulosa con un bajo contenido de lignina lo que resulta factible para la producción de bioetanol. En base a lo anteriormente referido, nuestra investigación tuvo como objetivo evaluar el rendimiento de un sistema de obtención de bioetanol a partir de biomasa de Jacinto de Agua a través de un pretratamiento alcalino mediante la explosión de vapor, seguida de una hidrólisis ácida y fermentación con inóculo de *S. cerevisiae*.



# CAPÍTULO I

## 1. PLANTEAMIENTO TEÓRICO

### 1.1. Problemática de la Investigación

Hay evidencia suficiente para afirmar que la capacidad de carga del planeta se ha sobrepasado debido al incremento de la población mundial (Allam et al., 2020), lo que ha intensificado la preocupación por el consumo energético y el agotamiento de los combustibles fósiles cuyas reservas se han visto comprometidas por métodos de extracción convencionales (Bote et al., 2020). Además, su quema contribuye significativamente al efecto invernadero, acelerando el calentamiento global (Laltha et al., 2021).

Por otro lado, el jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*), una planta acuática invasora, prolifera en cuerpos de agua como lagos, estanques y ríos, creciendo aceleradamente debido a las temperaturas cálidas y aguas ricas en nutrientes (Khan et al., 2019). Este crecimiento alcanza una tasa de aproximadamente 220 kg/ha/día (Bronzato et al., 2017), lo que genera grandes cantidades de biomasa que, al no gestionarse adecuadamente, se convierten en residuos ambientales.

El crecimiento descontrolado del jacinto de agua no solo representa una amenaza ecológica, sino que también contribuye a la eutrofización de los cuerpos de agua, un proceso que aumenta los niveles de nutrientes y reduce la cantidad de oxígeno disuelto (OD), impactando negativamente en la flora y fauna acuática (Struik et al., 2022). Este fenómeno reduce la biodiversidad y contribuye al estrés hídrico al incrementar la evapotranspiración, lo que a su vez disminuye la disponibilidad de agua para actividades esenciales como la agricultura y el consumo humano (Yan et al., 2022).

En el contexto del departamento de Arequipa, la presencia del jacinto de agua y otras especies vegetales acuáticas, como *Lemna minor* y *Scirpus americanus* (junco), ha sido documentada en

áreas como el lago de Tingo y las zonas ribereñas de Socabaya, Characato y la laguna de Mejía (Valencia, 2023; Ortiz, 2023). La expansión del jacinto de agua en estos ecosistemas ha generado graves impactos ambientales y económicos, afectando la pesca, elevando el desempleo en las comunidades ribereñas y amenazando la seguridad alimentaria (Abdul Wahhab & Al-Kayiem, 2021).

Sin embargo, el jacinto de agua, pese a sus efectos negativos, también ofrece una oportunidad importante para la producción de biocombustibles, debido a sus propiedades lignocelulósicas y su rápida capacidad de crecimiento. El uso de esta biomasa residual para la producción de bioetanol no solo contribuye a la recuperación de los ecosistemas acuáticos a través de la restauración de la biodiversidad al eliminar grandes cantidades de esta planta invasora, sino que también impulsa la economía circular, mejora la calidad del agua, promueve la sostenibilidad de los recursos hídricos y reduce la dependencia de combustibles fósiles al proporcionar una vía hacia una energía más limpia y renovable ofreciendo beneficios ecológicos como socioeconómicos convirtiendo un residuo problemático en un recurso valioso (Gebrehiwot, Dekebo, & Annisa, 2022).

## 1.2. Justificación

### 1.2.1. Ambiental

El bioetanol ha venido siendo obtenido a partir de biomasa de los residuos generados a partir de actividades forestales o aquellas relacionadas a la agricultura. Sin embargo, dicha obtención depende de la intervención del suelo a través del empleo de técnicas no sostenibles que arriesgan la fertilidad y productividad de este recurso (Nawaj Alam et al., 2021). Frente a lo mencionado, las plantas acuáticas están siendo consideradas como un recurso energético renovable dado a su rápido crecimiento y reproducción (Chen et al., 2021), de esta manera la biomasa de la macrófita

*E. crassipes* rica en hemicelulosa y celulosa, servirá para la producción de bioetanol debido a que posee un alto potencial para reducir la dependencia de los combustibles fósiles y con ello, garantizar la menor emisión de gases contaminantes a la atmósfera (Bauddh et al., 2017). Asimismo, la consideración de esta macrófita en procesos de conversión a bioenergía permitirá realizar un mejor control de su proliferación (Sharma & Aggarwal, 2020a).

### **1.2.2. Económica**

Al estar caracterizada por un rápido crecimiento y adaptabilidad, la biomasa lignocelulósica de Jacinto de agua puede ser utilizada de forma eficiente en vista de que su óptimo desarrollo no depende de la adición de químicos comúnmente usados en cultivos agrícolas lo que reduce los costos de producción. De esta manera la obtención de bioetanol a partir de macrófitas, es una opción prometedora, factible y rentable debido a su disponibilidad a bajo costo (Gaurav et al., 2020; Krishnan et al., 2020; Nawaj Alam et al., 2021).

### **1.2.3. Social**

La obtención de bioetanol permite tener en consideración la producción de energías sostenibles las cuales aseguran que la población goce de un ambiente con menores afectaciones ambientales. Sumado a ello, se ha referido que la producción de bioetanol a gran escala contribuirá a la generación de empleo (Sharma & Aggarwal, 2020b).

### **1.2.4. Tecnocientífica**

El diseño de un sistema de obtención del bioetanol utilizando biomasa de *E. crassipes* no ha sido aplicado con anterioridad en la ciudad de Arequipa. Por tal motivo, el presente trabajo de investigación pretende aplicar por primera vez en nuestra región este sistema con el fin de generar conocimiento y a la vez garantizar una mejora continua en cuanto al aprovechamiento de la

biomasa de especies con rápido crecimiento y adaptabilidad, de manera que impulse el desarrollo de tecnologías para la producción de energías sostenibles.

### 1.3. Objetivos

#### 1.3.1. *Objetivo General*

Evaluar el rendimiento de un sistema de obtención de bioetanol a partir de la biomasa de Jacinto de Agua (*Eichhornia crassipes*).

#### 1.3.2. *Objetivos Específicos*

- Determinar el contenido de lignina y humedad en la biomasa de Jacinto de Agua (*Eichhornia crassipes*).
- Establecer las condiciones experimentales de pretratamiento alcalino utilizando la biomasa pulverizada de Jacinto de agua.
- Obtener azúcares reductores mediante hidrólisis ácida a partir de la biomasa pretratada.
- Obtener bioetanol a partir de la fermentación del hidrolizado utilizando como inóculo a *S. cerevisiae*.
- Determinar el rendimiento del bioetanol obtenido en la destilación del fermentado.

### 1.4. Hipótesis

Dado que la biomasa de *Eichhornia crassipes* contiene componentes lignocelulósicos que pueden ser utilizados en la producción de biocombustibles, es probable que, a partir de procesos de pretratamiento, hidrólisis y fermentación de la biomasa, se obtenga bioetanol de segunda generación, a fin de sustituir los combustibles convencionales por tecnologías que contribuyan a mejorar la calidad ambiental en nuestra región.



## CAPÍTULO II

## 2. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 2.1. Marco Legal

#### 2.1.1. *Sobre Normativas Generales*

- Ley General del Ambiente-Ley N° 28611

#### 2.1.2. *Sobre Bioetanol*

- Ley N° 28054. Ley de Promoción del Mercado de Biocombustibles.
- Decreto Supremo N° 013-2005-EM. Reglamento de la Ley de Promoción del Mercado de Biocombustibles.
- DECRETO SUPREMO N° 075-2009-PCM. Decreto Supremo que crea la Comisión Multisectorial sobre Bioenergía.
- DECRETO SUPREMO N° 021-2007-EM. Aprueban Reglamento para la Comercialización de Biocombustibles.
- Ordenanza Regional N° 027-2008-GRSM/CR. Ordenanza Regional que crea el "Programa de Biocombustible de la Región San Martín- PROBIOSAM".
- Resolución de Consejo Directivo N° 036-2015-OEFA/CD. Determinan que el OEFA asume las funciones de seguimiento, supervisión, fiscalización, control y sanción en materia ambiental respecto de las actividades de biocombustible (biodiesel 100 y alcohol carburante) y petroquímica intermedia y final.
- Resolución Directoral N° 018-2019-INACAL-DN. Aprueban Normas Técnicas Peruanas sobre envases metálicos de hojalata para pinturas, biocombustibles, muebles y otros.
- Decreto Supremo N° 075-2009-PCM. Decreto Supremo que crea la Comisión Multisectorial sobre Bioenergía.

## 2.2. Antecedentes de la investigación

El uso continuo de combustibles fósiles en diferentes actividades plantea diversos desafíos ambientales en particular en lo que respecta a las emisiones de gases de efecto invernadero los cuales contribuyen a la degradación de la calidad ambiental de nuestro planeta (Ilo et al., 2020). En ese sentido, el bioetanol está atrayendo cada vez más la atención debido a las ventajas que posee como ser accesible, económico y respetuoso con el medio ambiente (Jelani et al., 2023). Por ello, hoy en día se viene utilizando como materia prima a plantas acuáticas consideradas como malezas que se caracterizan por ser ricas en hemicelulosa y celulosa, compuestos que se convierten en azúcar fermentable (Malherbe et al., 2023). Por ejemplo, un estudio realizado por Whangchai et al. (2021) utilizó biomasa de la lechuga de agua, la cual se recolectó, lavó y cortó en partes pequeñas para secarla a temperatura ambiente. El pretratamiento consistió en juntar 10 g de biomasa con NaOH. Después, se llevó a cabo la hidrólisis y fermentación, en la que se agregó celulosa al 1% y se ajustó el pH. Seguido a ello, la muestra de la solución se preparó con 200 ml y 1% del inóculo de la levadura *S. cerevisiae*; la fue cultivada en un caldo YPD. La cantidad total de azúcar se determinó por el método fenol-sulfúrico, asimismo, la medición de etanol se dio por medio de un ebullómetro. De la investigación se concluyó que la producción de bioetanol es mayor cuando se usa biomasa seca. Así también, se empleó la especie *Cyperus difformis* sometida a un pretratamiento con NaOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para la producción de bioetanol. Previo al pretratamiento, la planta acuática se lavó y secó a temperatura ambiente durante tres días y en horno a 50°C durante una noche para posteriormente ser molida y mezclarse con los componentes mencionados. Luego pasó por un proceso de hidrólisis enzimática con celulasa comercial y para la fermentación se utilizó *S. cerevisiae*. Finalmente, la evaluación del azúcar reductor se realizó con el método de ácido dinitrosalicílico (DNS) (Ramaraj & Unpaprom, 2019). También se comprobó la producción

de etanol a base de pétalos de *Rosa hybrida* cuyo diseño experimental consideró en el pretratamiento cuatro experimentos basados en 10 g de biomasa sometida a diferentes sustratos: agua normal, agua caliente, NaOH y H<sub>2</sub>SO a temperaturas diferentes. Como resultados se obtuvo que el tratamiento ácido logró una producción de 40.8 g/L de glucosa después de 120 horas de hidrólisis a 30°C con una concentración de 1,75 g/L de enzima *Accellerase* a un pH 5,5 y una velocidad de agitación de 120 rpm. Para la fermentación se consideró un tiempo de 180 horas con el mismo pH y temperatura que el anterior proceso logrando alcanzar 29,5 g / L de bioetanol (Sahu, 2021). Por su parte, Mejica et al. (2021) evaluó el potencial de *L. flava* para la producción de bioetanol haciendo uso de diversos pretratamientos alcalinos. Una vez recolectada, la especie se lavó y cortó en trozos pequeños para secarla y pulverizarla. Después, esta biomasa fue tratada con CaO al 1% y 2% y NaOH al 2%. La evaluación de azúcar reductora fue determinada con la adición de H<sub>2</sub>SO y fenol, y el método DNS se utilizó para la determinación del azúcar total. En la hidrólisis enzimática se utilizó celulosa comercial y el pH se ajustó a 5. Finalmente, se llevó a cabo la fermentación con *S. cerevisiae* al 2% para evaluar el porcentaje de alcohol a través de un ebullómetro. Frente al potencial de cuatro especies de plantas flotantes se propuso utilizar su biomasa para producir bioetanol. Para ello, se incluyeron procesos de sacarificación optimizados mediante el uso de una enzima durante 24 horas, luego de ello se procedió a una fermentación con *S. cerevisiae* durante 48 horas. Finalmente se obtuvo concentraciones de etanol de 0.19, 0.17, 0.19 y 0.16 g de etanol/g de biomasa seca para *L. punctata*, *L. aequinoctialis*, *S. polyrrhiza* y *W. arrhiza* respectivamente (Faizal et al., 2021). Para finalizar, también se ha reportado el uso de malezas acuáticas como *Lemna gibba*, *Lemna minor*, *Pistia stratiotes* y *Eichhornia sp* para la producción de bioetanol, las plantas se secaron al aire libre y en un horno caliente a 80°C durante 48 horas, para después ser triturada. El proceso productivo de Gusain & Suthar (2017) consideró una

sacarificación enzimática usando  $\alpha$ -amiloglucosidasa y la fermentación se dio mediante el uso de levadura de panadería. El rendimiento de *L. minor*, *L. gibba*, *P. stratiotes* y *Eichhornia sp.* fue de 10.89 g/L, 9.86 g/L, 10.73 g/L y 9.45 g/L respectivamente.

Otra de las malezas acuáticas comúnmente utilizadas para la producción de bioetanol es el Jacinto de agua (*E. crassipes*), tal como el estudio de Shanab et al. (2018) donde se trazó como objetivo evaluar la producción de biocombustibles sometiendo a la biomasa seca a un proceso de extracción de lípidos, las muestras se hidrolizaron con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 0.70% y se secaron a 105 °C durante 6 horas, luego de ello se neutralizaron con BaCO<sub>3</sub> y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min. A la solución acuosa se le agregó 0.15 gramos de *S. cerevisiae* a 30°C y se agitó a 120 rpm tomando muestras a 6 intervalos de tiempo. El porcentaje relativo de contenido de azúcar se midió con un refractómetro y para la confirmación de la producción de etanol se realizó la prueba de yodoformo logrando producir luego de dos horas un 58.6% de bioetanol. Así también, para comprender la viabilidad del Jacinto de agua en la producción de bioetanol, se realizó una sacarificación enzimática de la fracción celulósica de la biomasa seguida de una fermentación por *S. cerevisiae* alcanzando luego de 72 horas, 6.18 g/L de etanol con un rendimiento de 0.408 g/g y una productividad de 0.086 g/L\*h (Shankar et al., 2020). Dentro de este marco, en un estudio, al comparar el rendimiento del método de hidrólisis y fermentación por separado y simultáneo, se demostró que por el primer método se permite obtener una mayor producción de azúcares reductores debido a la temperatura del proceso de hidrólisis y a la vez se realiza una mejor selección de microorganismos para fermentar los azúcares. Con referencia al método simultáneo, la recirculación de la levadura es limitada debido a la presencia de residuos de lignina,

adicionalmente, la diferencia de temperaturas óptimas hace que la hidrólisis ralentice todo el proceso (Sharma & Aggarwal, 2020c).

Sin embargo, la bibliografía pone en evidencia que, al someter a la biomasa de *E. crassipes* a un pretratamiento, se permite eliminar la lignina dentro de su composición garantizando una mayor producción de bioetanol, por ello, es imprescindible determinar las condiciones óptimas de pretratamiento en la especie teniendo en cuenta términos de eficiencia de consumo de energía y proceso ecológico de la biomasa lignocelulósica (Rezania et al., 2020). En ese sentido, Das et al., (2016a) mediante una combinación de diferentes métodos de pretratamiento como el ácido y álcali bajo tratamiento con vapor, seguido de una sacarificación enzimática y fermentación utilizando un diseño compuesto central, demostraron que el pretratamiento con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> es el más eficiente obteniendo una producción máxima de etanol en un tiempo de fermentación equivalente de 37.7 horas mediante la evaluación e integración de factores como tiempo, pH y la relación de *Saccharomyces a Zymomonas*. Asimismo, luego de secar la biomasa de *E. crassipes* a 60° C en el horno se sometió a un pretratamiento alcalino con NaOH y biológico haciendo uso del hongo *Alternaria alternata*. Los espectros de Rayos X mostraron la cristalinidad después de los pretratamientos aplicados y se demostró que el tratamiento alcalino fue el que obtuvo mejor resultado en comparación al biológico (Kumar et al., 2021). Paralelamente, el objetivo de un grupo de investigadores fue analizar el efecto del pretratamiento con agua subcrítica utilizada para la recuperación de la celulosa de *E. crassipes*. Primero se determinó la concentración de celulosa y hemicelulosa obteniendo un equivalente a 25 y 11% respectivamente. Luego de ello, la biomasa seca fue sometida a H<sub>2</sub>SO a una concentración de 1 ml/g a una temperatura de 165°C y 50 bar durante 30 minutos. Al realizar diversas pruebas tecnológicas se obtuvo un contenido de celulosa

de 69.4% con un rendimiento de 89.9%, de esta manera se evidencia que la degradación de los materiales lignocelulósicos mejora el contenido de la celulosa (Nguyen et al., 2017). Otra investigación con Jacinto de agua tuvo como objetivo mejorar la producción de azúcares reductores a partir de biomasa seca a 60°C, la cual se trituró para ser sometida a diferentes pretratamientos como microbiano, ácido diluido microbiano y el alcalino diluido con microbios. Luego de ello, la biomasa pretratada se neutralizó y centrifugó a 5000 rpm durante 5 min para seguidamente ser inoculada con *S. cerevisiae* y así iniciar el proceso de fermentación a 30°C bajo condiciones de agitación de 120 rpm. Después, las muestras fermentadas se centrifugaron a 5000 rpm durante 8 minutos y el sobrenadante se utilizó para la determinación de bioetanol. Los azúcares reductores se midieron con el método DNS y el bioetanol obtenido se midió con cromatografía de gases. Los resultados evidencian que el pretratamiento con ácido diluido combinado microbiano es un método prometedor ya que tuvo una producción de 430.66 mg/g de azúcares reductores (Zhang et al., 2018). Finalmente, se estudiaron los factores que afectan la tasa de sacarificación hidrolítica de la lignocelulosa de *E. crassipes*. Para ello, la biomasa recibió un pretratamiento físico, seguido de una hidrólisis con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Para el análisis de la lignocelulosa se llevó a cabo un procedimiento analítico NREL y la estimación de la cantidad de azúcar reductora se logró mediante el método DNS. Finalmente, se utilizó el método de calentamiento por microondas en las muestras con el objeto de eliminar eficazmente partes de lignina y hemicelulosa (Lin et al., 2018).

Algunos estudios se han planteado analizar la composición química de *E. crassipes* y con ello, desarrollar un proceso eficiente para hidrolizar la biomasa en azúcares fermentables utilizando celulasa. Es así que Ruan et al. (2016) realiza un pretratamiento la biomasa seca de la especie con NaOH, luego de ello, ejecuta sacarificación enzimática con *Trichoderma reesei*

*celulosa*. Para los métodos analíticos se utilizó espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier y microscopía electrónica de barrido. Como resultado se obtuvo que el contenido de celulosa y hemicelulosa fue de 24.5 y 34.1% respectivamente y además de ello, el contenido de lignina fue el más bajo. Paralelamente, se planteó un diseño experimental utilizando biomasa de *E. crassipes* el cual se empleó *Candida shehatae* y *S. cerevisiae* en procesos de sacarificación y fermentación simultáneas, el sustrato fue sometido a tres pretratamientos: oxidación húmeda, ácido fosfórico – acetona y expansión de fibras de amoniaco. También se utilizaron enzimas de celulasa y hemicelulasa obteniendo así una concentración de etanol de 17.97 g/L con celulasa y hemicelulasa junto con *S. cerevisiae* y *C. shehatae* con un pretratamiento de expansión de fibras de amoniaco (Deka et al., 2018). Para aportar al objetivo, Xiao et al. (2017) pretrataron biomasa de *E. crassipes* con reactivo de Fenton y ácido peroxiacético, las temperaturas consideradas fueron de 40 y 25 °C respectivamente durante 24 horas y con una biomasa vegetal de 50 g/L. Luego de ello, se procedió a una sacarificación enzimática con *Trichoderma reesei*, la temperatura fue de 50 °C a 150 rpm, los experimentos se realizaron por triplicado y los azúcares reductores liberados durante el proceso de sacarificación se determinaron por el método DNS demostrando que el pretratamiento de Fenton presentó una mayor eficacia para aumentar la eliminación de lignina y el acceso a los carbohidratos de la biomasa de *E. crassipes*. Es necesario adicionar que, la metodología de una investigación que pretendía producir azúcares a partir de biomasa de *E. crassipes* se basó en seis combinaciones diferentes de carga de celulosa y beta glucosidasa (BGL) como enzima para la sacarificación de la biomasa pretratada con ácido o álcali. Las muestras se analizaron con intervalos de 12 h y los resultados evidenciaron un mejor rendimiento de azúcar con una mayor carga de celulosa y BGL lo que permitió afirmar que el aumento de la carga de

enzima puede mejorar la eficiencia de la sacarificación y además de ello, el artículo demostró una eficiencia de casi el 71% en la sacarificación de la biomasa (Bote et al., 2020).

Resulta preciso recalcar que, la producción de bioetanol no solo se ha trabajado con plantas sanas, sino también con biomasa sometida a fitorremediación de contaminantes como es el caso de Carreño (2021) quien tuvo como propósito evaluar la capacidad de producción de bioetanol a partir de *E. crassipes* utilizada en un sistema de fitorremediación de plomo a partir de experimentos con concentraciones de 500, 750 mg/l de plomo y un tratamiento de control utilizando dos biorreactores para la hidrólisis y fermentación. En el primero, la biomasa seca se hizo reaccionar con NaOH seguido de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y en la fermentación se utilizó *S. cerevisiae*. Como resultado se obtuvo que el tratamiento control llegó a producir 10 000 mg/l de bioetanol en 25 horas mientras que los tratamientos con concentraciones de 500 y 750 mg/l de plomo se obtuvo un 10% y 40% menos respectivamente.

## 2.3. Marco Teórico

### 2.3.1. Dependencia de los Combustibles Fósiles

#### 2.3.1.1. Dependencia de combustibles fósiles a nivel mundial

El incremento de la demanda energética a nivel mundial superará el 300% a finales del siglo. No obstante, la distribución de esta no se da de manera equivalente en los diferentes países. Según las estadísticas brindadas por el The World Bank, (2020), la quema de combustibles fósiles se constituye como la fuente de energía dominante en el mundo dado que dichos combustibles representan más del 80% del consumo mundial de energía primaria al resultar esencial para satisfacer las necesidades energéticas que tiene la población (Wang et al., 2022). Para el año 2019, los combustibles fósiles como el gas natural, carbón y petróleo representaron un 84% del total de energía primaria consumida, el petróleo por su parte tuvo una producción baja en el año 2020 en

comparación al año 2018 debido a la pandemia generada a causa del virus COVID-19. Con referencia al carbón, la producción anual tuvo un crecimiento equivalente al 1.5% en China e Indonesia, pero se ha reportado una reducción del 0.6% en el consumo del mismo. Finalmente, se ha percibido un aumento de la utilización del gas natural en el consumo de energía primaria reportándose un equivalente del 24.2% (Looney, 2021).

### **2.3.1.2. Dependencia de combustibles a nivel nacional**

El subsector de los hidrocarburos líquidos, en particular, contribuyó de manera importante al desarrollo del país desde los inicios de la República (Organismo Supervisor de la Inversión de Energía y Minería, 2015). De esa forma, García (2021) en el Boletín de Política Comercial y Ambiental patrocinado por el Programa Regional Seguridad Energética y Cambio Climático en América Latina (EKLA) reportó que la principal fuente de energía para el Perú fue el gas natural con un 40% seguido el petróleo con un 37%. Para el año 2020, el sector de hidrocarburos tuvo una producción de petróleo de 39 677 barriles por día mientras que la producción de gas natural fue equivalente a 1 452. Así también, con referencia a la demanda de gasolina, GLP y diesel esta ha sido de 40.2, 56.1 y 97.4 miles de barriles diarios respectivamente (Ministerio de Energía y Minas, 2021). Por su parte, Looney (2021) evidenció que para el año 2020 el consumo de carbón había incrementado un 0.1% haciendo un total del 44.6% como energía primaria. Asimismo, el petróleo había alcanzado una producción y consumo de 131 y 210 miles de barriles respectivamente mientras que el gas natural tuvo una producción y consumo de 12.1 y 7.1 billones de metros cúbicos.

### 2.3.1.3. Demanda de combustibles fósiles a nivel local

En el reporte semestral del monitoreo del mercado de hidrocarburos se reportó que la demanda de hidrocarburos líquidos había evidenciado un 11% en la ciudad de Arequipa. Con referencia a la distribución de la demanda de GLP se tuvo una dependencia del 10% a nivel local (Organismo Supervisor de la Inversión de Energía y Minería, 2017).

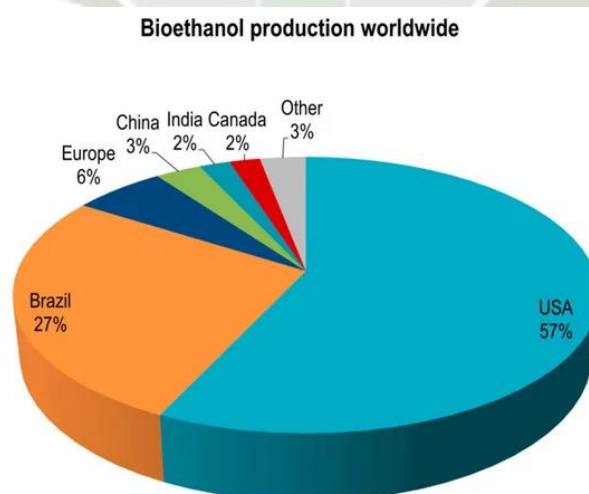
### 2.3.2. Alternativas Sostenibles de Producción de Energía

#### 2.3.2.1. Biocombustibles

Se definen como biocombustibles a aquellos que son obtenidos a partir de biomasa de productos agrícolas y forestales, así como de la parte biodegradable de los residuos industriales y municipales (Alalwan et al., 2019). Así también, se ha mencionado que este tipo de energía limpia presenta como principales ventajas el hecho de ser ecológicos, no son tóxicos y no producen gases de efecto invernadero (Thanigaivel et al., 2022). Por tal motivo, las tecnologías de producción a escala industrial se están desarrollando rápidamente (Lin & Lu, 2021).

#### Figura 1.

*Índices de producción de etanol en el mundo*



*Nota.* El gráfico presenta los porcentajes de producción de bioetanol en el mundo. Tomado de Vasić et al. (2021).

- ***Clases de Biocombustibles***

- a. Biocombustibles de primera generación**

Son aquellos productos que provienen de cultivos agrícolas mediante procesos termoquímicos o bioquímicos. Sin embargo, presentan algunas limitaciones como el uso de extensas áreas de tierra, elevado costo de la materia prima, alta demanda de agua y el impacto negativo al ambiente que amenaza a la biodiversidad (Alalwan et al., 2019; Ayodele et al., 2020; Mostofa, 2019).

- b. Biocombustibles de segunda generación**

Se producen a partir de cultivos no comestibles como los residuos biológicos y la biomasa lignocelulósica. Los materiales lignocelulósicos son uno de los más abundantes en el mundo, se pueden cultivar específicamente para la producción de bioenergía lo que conduce a una alta productividad. Es preciso mencionar que esta técnica es respetuosa con el medio ambiente dado que aumenta la eficiencia del uso de la tierra y la calidad del suelo (Sharma & Aggarwal, 2020b).

- c. Biocombustibles de tercera generación**

Estos biocombustibles se derivan de microbios y microalgas, los cuales son considerados un recurso energético alternativo viable que carece de inconvenientes asociados con biocombustibles de primera y segunda generación (Hirani et al., 2018).

### **2.3.2.2. Bioetanol**

Es uno de los biocombustibles alternativos más prometedores el cual es obtenido a partir de la fermentación de azúcares que se encuentran en la biomasa lignocelulósica (Ingrao et al., 2021). Sus ventajas principales son la reducción de las emisiones gases de efecto invernadero, la materia prima utilizada no pone en riesgo a la seguridad alimentaria e incluso minimizan el consumo de combustibles fósiles en el sector transporte (Faisal & Saeed, 2021).

- ***Clasificación del bioetanol***

**a) Bioetanol de primera generación**

El bioetanol de primera generación (1G) generalmente es producido a partir de almidón o sacarosa de la biomasa de las plantas. El proceso para la producción depende del tipo de biomasa, cabe resaltar que se ha determinado que la materia prima en base de azúcar tiene un mayor potencial para sustituir los combustibles fósiles debido a su bajo costo de producción (Ayodele et al., 2020; Mostofa, 2019).

**b) Bioetanol de segunda generación**

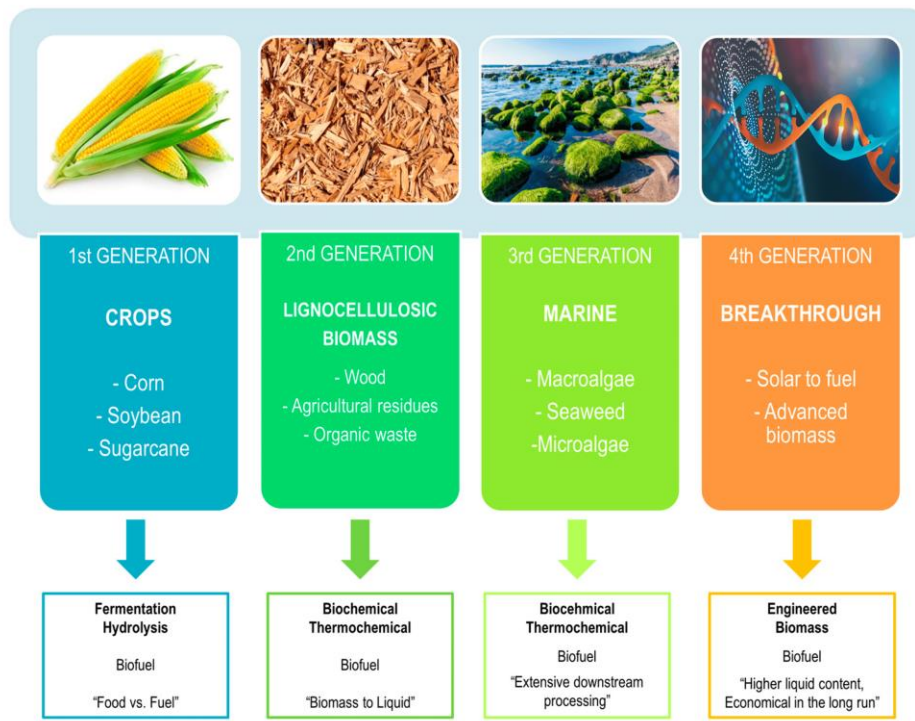
El bioetanol de segunda generación (2G) es producido a partir de biomasa lignocelulósica, que se encuentra compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina que son convertidos en etanol mediante diversos procesos termoquímicos o biológicos. A su vez, el bioetanol de 2G se divide por el tipo de materia prima usada la cual se clasifica en residuos agrícolas, forestales y cultivos energéticos (Ayodele et al., 2020; Mostofa, 2019).

**c) Bioetanol de tercera generación**

El bioetanol de tercera generación (3G) es producido a partir de la biomasa de microalgas y macroalgas dado que estas se pueden convertir de manera directa en energía, sin embargo, la producción de bioetanol 3G depende de factores como la tecnología y el entorno marino. Sus ventajas refieren al hecho de que para su reproducción no interfiere con la utilización de tierras y no requieren agua dulce, además de ello, su crecimiento es significativamente mayor en comparación al de los cultivos agrícolas (Jambo et al., 2016; Tan et al., 2020). Asimismo, la materia prima utilizada para la producción de bioetanol 3G posee una mínima cantidad de lignina y menos complejidad estructural en comparación a los materiales lignocelulósicos (Ocreto et al., 2021).

**Figura 2.**

Clasificación de bioetanol en base a la biomasa utilizada



*Nota.* Se muestra un gráfico de los tipos de bioetanol en relación a las generaciones. Tomado de Vasić et al. (2021).

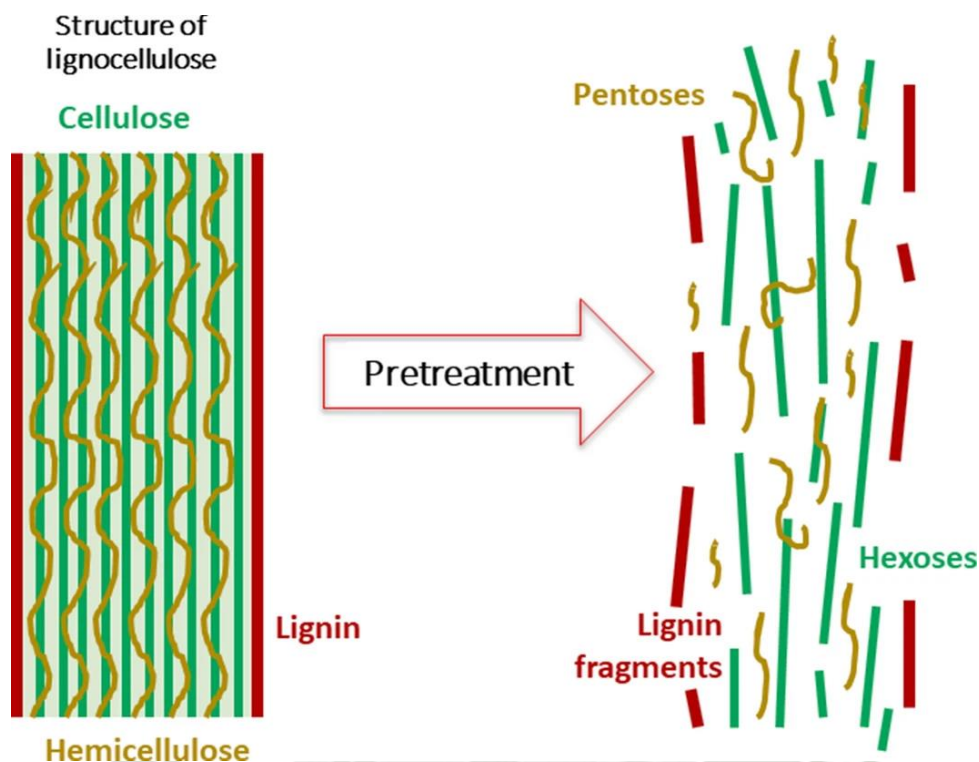
### 2.3.3. Conversión de Biomasa Lignocelulósica a Bioetanol

#### 2.3.3.1. Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica está compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina conectadas a través de enlaces químicos complejos de lignina-carbohidrato. Se ha mencionado que los carbohidratos poliméricos y ligninas fenólicas representan alrededor del 70% de la biomasa. Dentro de los constituyentes menores se tiene a la clorofila, resinas, cenizas y el residuo inorgánico rico en metales. Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas dependen de la variación de los componentes que presente la materia prima en estudio (Haldar & Purkait, 2021; Mankar et al., 2021).

**Figura 3.**

*Composición de la biomasa lignocelulósica*



*Nota.* En el gráfico se muestra los componentes de la biomasa lignocelulósica antes y después del pretratamiento. Tomado de Trejo et al. (2022).

- **Celulosa**

Es un componente básico de la pared celular vegetal y se caracteriza por ser altamente estable debido a las cadenas poliméricas bien ordenadas y la alta cristalinidad. Asimismo, es una cadena lineal de homopolisacáridos formada por subunidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos, sus propiedades dependen del grado de polimerización y la longitud de la cadena. Se ha reportado que las razones más importantes de la insolubilidad en la mayoría de los disolventes son los fuertes enlaces H y las fuerzas de Van Der Waals presentes en el compuesto (Devi et al., 2021; Woiciechowski et al., 2020).

- **Hemicelulosa**

Es una cadena ramificada de heteropolisacáridos habitualmente metilados y acetilados, no es tan cristalina como la celulosa y su estructura es amorfa. La composición de hemicelulosa en la planta puede variar del 20 al 30% en masa seca. Este polímero se asocia típicamente con otros componentes de la pared de las células vegetales como celulosa, lignina, compuestos fenólicos y proteínas mediante enlaces covalentes e hidrógeno, así como interacciones iónicas e hidrofóbicas. Se encuentra compuesto de diversos monosacáridos como pentosas, hexosas, ácidos urónicos y algunas trazas de ramnosa y fucosa. La distribución de estos monosacáridos en la hemicelulosa depende de la especie vegetal y el tipo celular. Además de ello, la diferencia básica con la celulosa es que esta es un homopolímero de glucosa. La hemicelulosa se divide en tres unidades principales: glucanos, xilanos y mananos las mismas que son sintetizadas por las glicosiltransferasas ubicadas en el aparato de Golgi (Huang et al., 2021; Scapini et al., 2021; Woiciechowski et al., 2020).

- **Lignina**

Es un grupo de polímeros aromáticos que resultan del acoplamiento múltiple y la reducción de 4 hidroxifenilpropanoides que se encuentran en estructuras tridimensionales. Este polímero contribuye al 40% del poder calorífico de la biomasa lignocelulósica y cumple la función de proteger la pared celular de las enzimas de degradación producidas por muchos microorganismos, proporcionándole rigidez y resistencia a la descomposición. Sin embargo, se ha convertido en un factor limitante significativo en la conversión de biomasa en biocombustibles dado que su eliminación requiere más recursos y un esfuerzo adicional para el proceso de conversión de la bioenergía (Bhatia et al., 2020; Devi et al., 2021). Además, se ha referido que la lignina tiene características menos propiedades hidrofílicas que la celulosa, lo que restringe la absorción de agua (Verma et al., 2021).

### 2.3.4. *Procesos para la transformación de la biomasa lignocelulósica a bioetanol*

#### 2.3.4.1. **Pretratamiento**

El pretratamiento es considerado un requisito fundamental para la desintegración de los componentes de la biomasa lignocelulósica lo que permite su óptima conversión a bioenergía. La eficacia de este método depende de su capacidad para deslignificar a la biomasa con el fin de aumentar la accesibilidad a la celulosa haciéndola más amorfa, utilizar un bajo consumo de energía, disminuir la polimerización y cristalinidad, evitar la producción de inhibidores de las enzimas y aumentar la superficie de la biomasa para la posterior sacarificación de la lignocelulosa en biocombustible. Este proceso puede diferir para cada sustrato debido a sus composiciones bioquímicas únicas (Sudhakar et al., 2021; Verma et al., 2021).

#### ❖ *Tipos de pretratamiento*

- **Pretratamientos físicos**

Este tipo de pretratamientos consisten en el aumento del área superficial de la biomasa por medio de la reducción de la cristalinidad y el tamaño de las partículas presentes. La extrusión mecánica, molienda, compresión, trituración, secado, ultrasonido y pirólisis son los métodos más comunes. Se ha mencionado que, en el pretratamiento térmico, los compuestos complejos se descomponen en azúcares, lo que a su vez mejora el proceso de fermentación y la generación del producto. Por su parte, la trituración mecánica no produce inhibidores lo que constituye una ventaja en el proceso de hidrólisis enzimática. Sin embargo, los pretratamientos mecánicos no eliminan la lignina de forma efectiva y además, los consumos de energía son más altos (Kumar et al., 2020; Sheng et al., 2021; Sudhakar et al., 2021)

- **Pretratamientos químicos**

Estos pretratamientos se utilizan con la finalidad de aumentar la biodegradabilidad de la celulosa al eliminar la lignina y/o hemicelulosa y también, para disminuir el nivel de polimerización y cristalinidad de la celulosa (Saravanan et al., 2021). El pretratamiento químico hace uso de diferentes ácidos, álcali, líquidos iónicos, solventes orgánicos, entre otros (Das et al., 2021). Se han reportado dos tipos principales de pretratamientos químicos.

- **Alcalino**

Este método tiene como finalidad mejorar la accesibilidad de las enzimas a la celulosa aumentando la porosidad de la materia prima lo que garantiza una hidrólisis y fermentación eficientes de los azúcares para la producción de bioetanol. En el desarrollo de este pretratamiento se produce la ruptura del complejo carbohidrato de lignina mediante reacciones de solvatación y la saponificación que cristalizan y dilatan la celulosa. Así también, se eliminan los grupos acetilos y ácido urónico en la hemicelulosa (Bhatia et al., 2020; Das et al., 2021; Mankar et al., 2021).

- **Ácido**

El pretratamiento ácido se basa en la ruptura de los enlaces hidrógeno existentes entre la celulosa y hemicelulosa con ácidos diluidos y concentrados. (Wu et al., 2022). Este tipo de pretratamiento mejora la digestibilidad mediante la solubilización y precipitación de la lignina garantizando la disponibilidad de la celulosa para procesos posteriores. Los parámetros que afectan la eficiencia del método pueden ser la proporción de sólido a líquido, el tamaño de la partícula de lignocelulosa, la concentración del ácido, temperaturas y tiempo del pretratamiento (Saravanan et al., 2021). Los ácidos generalmente usados son el ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico y ácido acético (Mankar et al., 2021).

- **Pretratamientos biológicos**

El enfoque de pretratamiento biológico utiliza microorganismos como bacterias y hongos para modificar la biomasa lignocelulósica haciéndola más susceptible a la posterior digestión enzimática (Saravanan et al., 2021). Este tipo de pretratamiento posee importantes ventajas como el poco uso de energía y químicos, sin embargo, no se ha encontrado un proceso rápido y eficiente (Das et al., 2021).

- **Pretratamiento oxidativo**

Este pretratamiento incluye el uso de un oxidante que ayuda en la degradación de la lignocelulosa. El peróxido de hidrógeno y el ozono son oxidantes que tienen como función mejorar la accesibilidad de la celulosa mediante la eliminación de hemicelulosa y lignina. La oxidación húmeda afecta directamente a los componentes de la biomasa lignocelulósica, la lignina sufre oxidación y escisión de manera integral, la hemicelulosa se descompone en azúcares y la celulosa se degrada en ácidos orgánicos (Sudhakar et al., 2021). Se ha referido que el tratamiento con peróxido de hidrógeno es un proceso en el que se descompone parcialmente la lignina y hemicelulosa y, además, facilita el acceso de enzimas como las celulasas a la biomasa lignocelulósica (Kumar et al., 2020).

#### **2.3.4.2. Hidrólisis**

El desarrollo de este proceso conlleva a la transformación de las macromoléculas en productos más sencillos caracterizados por ser fácilmente degradables. Este proceso implica la transformación de la celulosa y hemicelulosa en azúcares fermentables como la hexosa y pentosa (Devi et al., 2021). La celulosa posee una estructura cristalina lo que trae por consecuencia que el proceso de hidrólisis sea más complejo que la hemicelulosa (Abo et al., 2019).

a) *Tipos de hidrólisis*

- **Hidrólisis ácida**

Este tipo de hidrólisis utiliza diferentes tipos de ácido, en primer lugar, se tienen a los concentrados donde el proceso es sometido a temperaturas bajas lo que permite la solubilización de los polisacáridos generando como residuo a la lignina y una alta tasa de conversión de azúcar, sin embargo, requieren de altos costos de operación y mantenimiento debido a su naturaleza tóxica generado de subproductos indeseables. Por otro lado, se pueden utilizar ácidos diluidos que, a diferencia de los concentrados, requieren de temperaturas altas para garantizar un mejor rendimiento obteniendo como residuo lignina y celulosa. Asimismo, en este proceso se producen inhibidores fenólicos, furfural y aldehídos (Abo et al., 2019; Amiri & Karimi, 2018; Sharma & Aggarwal, 2020d).

- **Hidrólisis alcalina**

En este tipo de hidrólisis la biomasa experimenta un incremento del área superficial interna y a su vez, evidencia una disminución del nivel de cristalización garantizando así la separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos. Sin embargo, la efectividad es dependiente de la cantidad de lignina de la que esté compuesta la materia prima, es preciso resaltar que en el proceso se pueden formar inhibidores o sufrir la pérdida de productos (Amiri & Karimi, 2018).

- **Hidrólisis enzimática**

Este proceso se basa en la degradación microbiana de los residuos lignocelulósicos mediante la aplicación de enzimas que permiten la producción de azúcares fermentables y el ahorro de energía como en el caso de la celulasa. Las enzimas ayudan a liberar los azúcares fermentables

de la hemicelulosa y la celulosa reduciendo la recalcitrancia de la lignocelulosa para mejorar la generación de bioetanol a partir de la biomasa (Offei et al., 2018).

La hidrólisis enzimática es un proceso catalítico heterogéneo complejo que involucra múltiples procesos que incluyen la cinética de transferencia de masa molecular y la cinética de reacción. En comparación a la hidrólisis ácida, este tipo de hidrólisis puede realizarse en condiciones suaves y no produce inhibidores lo que reduce el costo operativo (Sharma et al., 2020; Zhang et al., 2021).

#### ***b) Factores que influyen en el proceso de hidrólisis***

Son diversos los factores que afectan la hidrólisis, uno de ellos es la cantidad significativa de lignina que se encuentra en la biomasa lignocelulósica. Asimismo, las características estructurales que posee la celulosa como la dimensión de las partículas, cristalinidad, grado de polimerización, área superficial accesible afectan el proceso de hidrólisis.

Es importante mencionar que, si la biomasa lignocelulósica es secada posterior a cualquier pretratamiento acuoso, los poros de la microestructura de la biomasa podrían presentar alteraciones ocasionando una disminución del hidrolizado. Además, se ha referido que se obtiene una mayor concentración de azúcares reductores mediante la utilización de una concentración alta de sustrato lo que hace que la hidrólisis sea más rentable en comparación a una carga baja a moderada. El tamaño de partícula es un parámetro importante en los procesos de producción de bioetanol dado que este permite obtener rendimientos adecuados, autores como Vieira et al. (2023) mencionan que las partículas más grandes pueden obstaculizar el acceso de los reactivos a las fibras lignocelulósicas, lo que resulta en bajos contenidos de carbohidratos y altos de lignina, por el contrario, las partículas más pequeñas pueden favorecer la hidrólisis excesiva de carbohidratos, lo que también conduce a bajos contenidos de lignina. Además de ello, las partículas de menor

tamaño aumentan la reducción del grado de cristalinidad y polimerización de la celulosa por lo que contribuyen al aumento del área superficial del sustrato a tratar químicamente, con la consiguiente mejora en la homogeneidad y uniformidad del proceso utilizando reacciones más eficientes (Codoche & López, 1989). Por lo tanto, Liebl et al. (2019) concluye que la reducción del tamaño es un paso previo para lograr la sacarificación debido a que ha demostrado una influencia en el rendimiento de azúcar. Sin embargo, la reducción del tamaño de la partícula conlleva a una operación que demanda mucho esfuerzo y energía (Yang et al., 2023).

Finalmente, con referencia al agua, este resulta ser un factor clave dado que funciona como reactivo en la escisión de los enlaces glucosídicos, así como medio de reacción que difunde enzimas, sustratos y azúcares obtenidos del proceso (Da Silva et al., 2020; Kumar et al., 2018; Sheng et al., 2021).

#### **2.3.4.3. Fermentación**

La fermentación es un proceso biológico directamente proporcional a la sacarificación dado que, cuanto mayor sea la hidrólisis, mayor será el rendimiento del bioetanol obtenido. En este proceso, los microorganismos como las levaduras y bacterias, en condiciones anaeróbicas, convierten los azúcares reductores en etanol y CO<sub>2</sub>. Se ha referido que su eficiencia depende de la naturaleza prima y del microorganismo que se utilice y que, con la finalidad de garantizar un proceso eficiente, diversos autores han utilizado diversos enfoques como la hidrólisis y fermentación separadas, sacarificación y fermentación simultáneas, sacarificación simultánea y co-fermentación y, bioprocesamiento consolidado (Prasad et al., 2019; Sharma & Aggarwal, 2020b; Sharma et al., 2020c).

- *Saccharomyces cerevisiae*

Este organismo se considera el mejor fermentador de la hexosa, por lo que suele emplearse en producir alcohol. Se caracteriza por presentar una alta productividad y en comparación a otros organismos, tiene la capacidad de sobrevivir a altas concentraciones de inhibidores presentes en la biomasa hidrolizada, además de ello, es tolerante al estrés y presenta una alta resistencia a la infección por bacteriófagos (Sharma & Arora, 2020). En condiciones anaeróbicas, esta levadura produce etanol a partir del ácido pirúvico generado a partir del catabolismo del azúcar, dicho ácido se convierte a través del acetaldehído en etanol regenerando NAD<sup>+</sup> para permitir la glucólisis y la producción de ATP (Favaro et al., 2019).

- ***Factores que limitan a la fermentación***

En el proceso de fermentación, a una temperatura alta el crecimiento de las células disminuye de manera significativa, este fenómeno da como resultado un cambio en la actividad de transporte o el nivel de saturación de compuestos solubles y disolventes en las células que podría aumentar la acumulación de toxinas dentro de las células incluido el etanol. En consideración a la influencia del pH, este juega un papel importante en la determinación de la vía de fermentación utilizada en los procesos de producción de etanol anaeróbico ya que los valores óptimos de este parámetro se encuentran en un intervalo comprendido de 4.0 a 5.0. Dado que cuando el pH es inferior a 4.0, el tiempo de incubación para la concentración máxima de etanol se prolonga, sin embargo, cuando el valor del pH se encuentra por encima de 5.0 la cantidad de etanol producido disminuye. Por otro lado, las elevadas concentraciones de sustrato inhiben el proceso de fermentación de etanol. Finalmente, la eficiencia de este proceso depende también de la hidrólisis y la elección de microorganismos apropiados con el fin de reducir la producción de sustancias tóxicas inhibidoras consiguiendo así, un alto rendimiento de etanol (Prasad et al., 2019).

#### 2.3.4.4. Destilación

La destilación es el proceso que demanda un mayor consumo de energía en la producción de bioetanol. Este proceso comienza con la entrada de la biomasa fermentada para posteriormente, ser calentada mediante un intercambiador de calor. En la parte inferior de la destilación, el etanol se condensa, una parte queda como el reflujo y otra como el producto rico en etanol (Gavahian et al., 2019; Pataro et al., 2020).

- *Destilación simple*

La destilación simple es un proceso que implica la evaporación controlada y la posterior condensación de un componente específico de una mezcla líquida. Esta técnica de separación permite incrementar la concentración de un determinado componente o extraer componentes casi puros de la mezcla. El principio de la destilación se basa en la diferencia de puntos de ebullición entre los componentes, lo que hace que uno de ellos se transforme en vapor. (Silvestre et al., 2019).

#### 2.3.5. Macrófitas

Las macrófitas son organismos fotosintéticos vasculares que cuentan con células especializadas denominadas traqueidas las cuales le permiten el transporte de agua y nutrientes. Se desarrollan en ecosistemas dulceacuícolas donde el agua fluye a velocidades bajas y tienen una alta disponibilidad de luz. Se reproducen rápidamente por medio de semillas, propagación vegetativa y clonal. Estas plantas se clasifican en cuatro categorías: flotantes, emergentes, sumergidas y plantas de hojas flotantes. En referencia a su distribución, las macrófitas se encuentran extendidas alrededor del mundo desde los trópicos hasta en las zonas templadas, sin embargo, debido a su rápido crecimiento y desarrollo son consideradas malezas. Por otro lado, son denominadas “holobiontes” a raíz de que brindan hábitat a muchos organismos, cumplen diversas funciones como el control de la erosión, regulación de la temperatura, estabilización del oxígeno

y absorción de metales pesados y COP; por ende, son utilizadas en muchos sistemas de fitorremediación. Sin embargo, debido a su rápida reproducción, llegan a cubrir la superficie de los cuerpos de agua impidiendo el paso de los rayos solares teniendo como consecuencia la disminución del oxígeno disuelto afectando la flora y fauna del ecosistema. Así también, el desarrollo de la especie afecta la situación económica a través del aumento de las tasas de desempleo y pone en riesgo la seguridad alimentaria de las comunidades aledañas a los ecosistemas (Ankit et al., 2020; Kochi et al., 2020; Kurniawan et al., 2021; Martínez-Soto et al., 2021).

### 2.3.5. Jacinto de Agua

#### a) Descripción morfológica de Jacinto de Agua

*Eichhornia crassipes* es una macrófita acuática monocotiledónea que flota libremente sobre la superficie de los cuerpos de agua dulce con un ligero movimiento, su método de reproducción puede ser vegetativo, pero también, sexual. Sus semillas pueden llegar a sobrevivir en estado latente hasta 20 años. Su sistema de raíces está categorizado como no enraizado lo que le da paso a la acción depuradora reteniendo en sus tejidos a metales pesados, compuestos orgánicos, colorantes, entre otros parámetros con ayuda de la asociación de microorganismos (Sindhu et al., 2017). Es importante mencionar que esta especie está compuesta entre un 18-35% de celulosa, 18-49% de hemicelulosa y 3-9% de lignina; es decir, contiene baja cantidad de lignina y alto contenido de celulosa (Guo et al., 2022).

#### b) Descripción taxonómica de Jacinto de Agua

- Reino: *Plantae*
- División: *Magnoliophyta*
- Clase: *Liliopsia*

- Orden: *Commelinales*
- Género: *Eichhornia*
- Especie: *E. Crassipes*

### **2.3.6. Análisis de Varianza (ANOVA)**

El análisis de varianza (ANOVA) es un procedimiento estadístico que puede ser utilizado para probar la hipótesis inicialmente planteada. Su aplicación puede darse cuando se tienen una variable de medición y dos o más variables nominales que se encuentran en combinación con un solo valor de la variable nominal de más alto nivel.

Para aplicar ANOVA se tienen que cumplir que los tratamientos y los efectos ambientales sean aditivos y los errores experimentales aleatorios, independientes y normalmente distribuidos alrededor de la media cero y con una varianza común. Por lo tanto, se necesita la replicación para estimar el error experimental y la aleatorización para tener la probabilidad o el nivel de significancia correctos. El análisis ANOVA clasifica la variación total en dos fuentes independientes: variación entre tratamientos y variación dentro de los tratamientos (Ahmed, 2020).

### **2.3.7. Modelo de Superficie de Respuesta**

La metodología de superficie de respuesta (RSM) consiste en un grupo de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas en el desarrollo de una relación funcional adecuada entre una respuesta de interés,  $y$ , y una serie de variables de control asociadas denotadas por  $x_1, x_2, \dots, x_k$ . En general, dicha relación se desconoce, pero puede aproximarse mediante un modelo polinomial de bajo grado de la forma.

El propósito de considerar este modelo en el análisis de un ensayo responde al hecho de:

- Establecer una relación aproximada, entre  $y$  y  $x_1, x_2, \dots, x_k$  que pueda usarse para predecir valores de respuesta para configuraciones dadas de las variables de control.
- Determinar a través de pruebas de hipótesis, la significancia de los factores cuyos niveles están representados por  $x_1, x_2, \dots, x_k$
- Determinar los ajustes óptimos de  $x_1, x_2, \dots, x_k$  que dan como resultado la respuesta máxima (o mínima) en una determinada región de interés.





## CAPÍTULO III

### 3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

#### 3.1. Tipo y nivel de investigación

##### 3.1.1. *Enfoque de la investigación*

El enfoque de la presente investigación es cuantitativo debido a que se utilizará la observación del proceso en forma de recolección de datos para seguidamente analizarlos por medio de la estadística a fin de comprobar la hipótesis planteada.

##### 3.1.2. *Tipo de investigación*

El tipo de investigación se concibe como aplicada científica esto a razón de que, la misma, se utiliza con el objeto de realizar la medición de variables específicas para pronosticar un determinado comportamiento.

##### 3.1.3. *Nivel de la investigación*

El nivel de la investigación es exploratorio ya que se evaluará la eficiencia en la producción de bioetanol a partir de biomasa seca de la especie *Eichhornia crassipes* (Jacinto de Agua).

##### 3.1.4. *Diseño de la investigación*

El diseño que presenta esta investigación es experimental para lo cual se empleó un Box Behnken con 3 puntos centrales para determinar los valores óptimos de las variables intervinientes en el proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa seca de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de Agua).

### 3.1.5. *Campo de investigación*

La unidad de análisis de la presente investigación es la plántula, *Eichhornia crassipes* (Jacinto de Agua), la cual será sometida a pretratamiento, hidrólisis, fermentación y destilación.

### 3.1.6. *Variables*

Las variables de estudio en esta investigación se mencionan a continuación:

- **Variable independiente:** Condiciones del pretratamiento de la biomasa pretratada
- **Variable dependiente:** Rendimiento del bioetanol

**Tabla 1.**

*Operacionalización de Variables*

Contextualización	Dimensiones	Indicadores	Instrumento De Medida	Unidad De Medida
<b>Variable independiente:</b> Biomasa de jacinto de agua	Establecimiento de las condiciones de pretratamiento de la biomasa	Concentración de NaOH	-	% p/v
		Tiempos de pretratamiento	Cronómetro	min
		Tamaño de partícula de biomasa	Tamices ASTM	µm
<b>Variable dependiente:</b> Evaluación del rendimiento del bioetanol	Rendimiento de bioetanol	Concentración de azúcares reductores	Espectrofotómetro UV visible	g/L
		Concentración de etanol	Espectrofotómetro UV visible	g/L
		Volumen obtenido de etanol	Probeta graduada	ml

*Nota.* Elaboración propia

### 3.1.7. *Diseño experimental*

El diseño experimental utilizado en la investigación es el Box Behnken con tres puntos centrales, que es una técnica estadística sistemática que resulta útil para la modelización y análisis en aplicaciones en las que una respuesta de interés es influenciada por distintas variables y cuyo objetivo es encontrar los valores óptimos para las variables independientes que maximizan, minimizan o cumplen ciertas restricciones en la variable respuesta.

El diseño Box Behnken planteado considera tres puntos centrales y tres variables de estudio las cuales son: Tamaño de la partícula, Concentración de Hidróxido de Sodio y Tiempo de Explosión a Vapor (Tabla 2).

- **Orden de la experimentación:** Modelo de primer orden
- **Número de experimentos:** 45
- **Modelo matemático que describe el experimento:**

$$2.9425 + -0.746114 * A + 0.0111541 * B + -0.00821672 * C + 0.00235941 * AB + 0.000827224 * AC + 0.000122075 * BC + 0.0569499 * A^2 + -0.000624586 * B^2 + 7.17429e - 06 * C^2 \quad (1)$$

**Donde:**

**A:** Concentración de NaOH

**B:** Tiempo de pretratamiento

**C:** Tamaño de partícula

**AB:** Concentración de NaOH \* Tiempo de pretratamiento

**AC:** Concentración de NaOH \* Tamaño de partícula

**BC:** Tiempo de pretratamiento \* Tamaño de partícula

**Tabla 2.**

*Matriz de diseño experimental*

N° de Pruebas	Bloques	Variables naturales			Variable de Respuesta Y [Azúcares reductores] (g/L)
		Concentración de NaOH (%)	Tiempo de pretratamiento (min)	Tamaño de partícula (µm)	
1	1	1	45	200	Y1
2	1	1	15	200	Y2
3	1	2	30	200	Y3
4	1	1	30	250	Y4
5	1	3	30	250	Y5
6	1	2	45	250	Y6
7	1	3	30	150	Y7
8	1	3	15	200	Y8
9	1	2	15	150	Y9
10	1	3	45	200	Y10
11	1	2	30	200	Y11
12	1	2	15	250	Y12
13	1	2	45	150	Y13
14	1	1	30	150	Y14
15	1	2	30	200	Y15
16	2	1	45	200	Y16
17	2	1	15	200	Y17
18	2	2	30	200	Y18
19	2	1	30	250	Y19
20	2	3	30	250	Y20
21	2	2	45	250	Y21
22	2	3	30	150	Y22
23	2	3	15	200	Y23
24	2	2	15	150	Y24
25	2	3	45	200	Y25
26	2	2	30	200	Y26
27	2	2	15	250	Y27
28	2	2	45	150	Y28
29	2	1	30	150	Y29
30	2	2	30	200	Y30
31	3	1	45	200	Y31
32	3	1	15	200	Y32
33	3	2	30	200	Y33
34	3	1	30	250	Y34
35	3	3	30	250	Y35

36	3	2	45	250	Y36
37	3	3	30	150	Y37
38	3	3	15	200	Y38
39	3	2	15	150	Y39
40	3	3	45	200	Y40
41	3	2	30	200	Y41
42	3	2	15	250	Y42
43	3	2	45	150	Y43
44	3	1	30	150	Y44
45	3	2	30	200	Y45

*Nota.* Elaboración propia

### 3.1.8. *Materiales y equipos*

Para el desarrollo del trabajo se emplearon los materiales, reactivos y equipos detallados a continuación:

#### a. **Reactivos:**

**Tabla 3.**

*Reactivos utilizados en la investigación*

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>
Hidróxido de sodio	1, 2, 3%
Ácido sulfúrico	3%
Fenol	-
Ácido 3,5 dinitrosalicílico	-
Tartrato de sodio y potasio	-
Caldo y Agar Saboraud	-
Alcohol	96%

*Nota.* Elaboración propia

**b. Equipos:**

- Espectrofotómetro (UV-visible) Thermoscientific - Evolution 201
- Balanza analítica Marca Sartorius, Modelo Entris 224-1S
- Autoclave
- Estufa
- Agitador magnético con calentador
- Micropipetas
- Cocina Eléctrica
- Incubadora
- Baño termostático
- Horno Esterilizador
- Equipo Soxhlet
- Centrífuga
- Cámara de Neubauer
- Microscopio
- Equipo de filtración al vacío

**c. Materiales:**

- Pipetas
- Probetas (mL)
- Fiolas
- Papel Filtro rápido y lento
- Material de refrigeración (cooler)
- Envases para muestreo

- Vasos de Precipitado (5 mL, 10 mL, 50mL y 100mL)
- Pizetas
- Bagueta de vidrio
- Embudo de vidrio
- Frascos de vidrio ámbar (120, 250, 500 y 1000 mL)
- Frascos de vidrio Durán
- Papel indicador pH
- Tubos cónicos de centrífuga
- Filtros de jeringa
- Llaves de tres vías
- Guantes quirúrgicos
- Microtubo Eppendorf (2 mL)
- Placas Petri
- Gasa estéril 10x10
- Matraz Erlenmeyer (250 ml)
- Papel aluminio
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Trípode
- Mechero
- Algodón
- Suero fisiológico
- Levadura *Saccharomyces cerevisiae*

- Matracas de filtración
- Varillas agitadoras
- Crisoles filtrantes
- Jeringas desechables

## 3.2. Métodos de Investigación

### 3.2.1. *Determinación de lignina y humedad del Jacinto de Agua (Eichhornia crassipes)*

#### 3.3.1.1. *Obtención de la materia vegetal*

Las plántulas de *Eichhornia crassipes* fueron adquiridas de un cuerpo de agua ubicado en el distrito de Mejía con coordenadas  $17^{\circ}07'16.4''$  S,  $-71^{\circ}53'21.9''$  W, luego de ello, se almacenaron en bolsas para su posterior limpieza. Asimismo, se gestionó la identificación de la especie en el Instituto Científico Michael Owen Dillon (IMOD).

#### **Figura 4.**

*Ubicación de recolección de la plántula de Eichhornia crassipes*



*Nota.* Elaboración propia, obtenida de Google Earth.

### 3.3.1.2. Limpieza y secado de las plántulas

El lavado de las plántulas se realizó con agua de grifo para eliminar impurezas, luego de ello, se cortaron en pedazos para ser pesadas y después secadas en estufa a 80°C durante 48 horas (Carreño, 2019; Gusain & Suthar, 2017; Kumar et al., 2021).

### 3.3.1.3. Molienda y almacenamiento de *Eichhornia crassipes*

La biomasa seca se molió con el apoyo de una licuadora industrial a fin de disminuir su granulometría, luego de ello, la muestra resultante se tamizó por mallas de número 40, 60 y 80. La biomasa obtenida en cada tamiz se almacenó en envases de polipropileno herméticamente cerrados y almacenados a 4°C.

### 3.3.1.4. Determinación de humedad de *Eichhornia crassipes*

La determinación de la humedad se obtuvo con el peso de la plántula fresca y el peso de la plántula seca. Teniendo en cuenta la siguiente fórmula matemática:

$$\frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \% = \% \text{ de humedad (2)}$$

En donde:

$P_i$  = Peso inicial

$P_f$  = Peso final

### 3.3.1.5. Determinación de lignina

Para la determinación de este compuesto en la especie de estudio, se armó un equipo Soxhlet el cual utilizó como disolvente el alcohol a 96° a fin de extraer compuestos específicos de la biomasa seca de Jacinto de Agua por medio de un proceso continuo.

Luego la determinación de lignina, se colocaron 4 crisoles de gooch dentro de un horno debidamente rotulados durante 4 horas a 105° C para luego enfriarlos y registrar su peso. Para la Determinación de Sólidos Totales en Biomasa, se pesaron 300 mg de muestra seca de biomasa en un tubo, se añadieron 3 ml de ácido sulfúrico al 72% a cada tubo, luego se mezcló con una varilla agitadora para ser colocados a baño maría a 30°C durante un periodo de 60 minutos, se precisa que la muestra que se revolvió cada 5 a 10 minutos para un garantizar un contacto uniforme entre el ácido y las partículas. Al finalizar la hidrólisis, se diluyó el ácido a 79 ml de agua destilada utilizando una bureta. Los tubos se colocaron en una rejilla para ser esterilizados en autoclave durante una hora a 121°C, luego de ello, se dejaron enfriar antes de quitarle las tapas.

- ***Análisis de muestras para determinación de lignina insoluble en ácido***

La solución de hidrólisis esterilizada se filtró al vacío con los crisoles gooch previamente pesados, la solución filtrada se capturó en un matraz filtrante. Seguidamente, se transfirió el líquido filtrado a una fiola para determinar la lignina soluble en ácido, esta se almacenó en refrigeración para conservar el licor de hidrólisis.

Para transferir la biomasa restante al crisol filtrante se utilizó agua destilada, luego de ello, se secó el crisol a 105 °C culminado el tiempo las muestras se retiraron del horno y se enfriaron en un desecador. Se registró el peso del crisol y el residuo seco. Se colocaron nuevamente los crisoles en el horno durante 24 horas para luego ser enfriados y registrar su peso.

Para los cálculos de determinación de lignina se usaron las siguientes ecuaciones:

$$LI = M_{\text{filtro+lignina}} - M_{\text{filtro seco}} \quad (3)$$

Donde:

LI= Lignina insoluble (g)

$M_{\text{filtro+lignina}}$  = Masa del filtro + lignina

$M_{\text{filtro seco}}$  = Masa del filtro seco

- **Análisis de muestras para determinación de lignina soluble en ácido**

La alícuota se analizó en el espectrofotómetro UV-Visible a través de la medición de la absorbancia a una longitud de onda (205 nm), cada muestra se analizó por triplicado (Mafei et al., 2020). La cantidad de lignina soluble se determinó con el siguiente cálculo:

$$L_s = \left( \frac{A_{hid}}{105} \right) \times (f) \times 0.1 \quad (4)$$

Donde:

$L_s$  = Lignina soluble

$A_{hid}$  = Absorbancia de hidrolizados ácidos (205 nm)

$f$  = factor de dilución de hidrolizados ácidos

$$LT = \left( \frac{L_i + L_s}{M_i} \right) \times 100\% \quad (5)$$

Donde:

$LT$  = Lignina total

$M_i$  = Masa inicial seca

### 3.2.2. Establecimiento de condiciones experimentales de pretratamiento alcalino

#### 3.2.2.1. Obtención del modelo experimental de la etapa de pretratamiento

En esta fase se llevó a cabo el diseño experimental, implementando un diseño Box Behnken que incluyó un total de 45 tratamientos con tres puntos centrales. Para cada uno, se utilizaron 0,5 gramos de biomasa seca de jacinto de agua, con granulometrías de 150, 200 y 250  $\mu\text{m}$ , que

reaccionaron con 10 ml de hidróxido de sodio en concentraciones del 1%, 2% y 3%, durante intervalos de 15, 30 y 45 minutos. El proceso se llevó a cabo mediante explosión a vapor en autoclave a 121°C, de acuerdo con la Tabla 2 (Ramaraj & Unpaprom, 2019). Al finalizar el tiempo establecido, las muestras fueron filtradas y la biomasa pretratada se lavó con agua destilada hasta alcanzar un pH de 7. Posteriormente, la biomasa fue colocada en placas Petri para su secado en horno. Después de esta operación, se almacenó a 4°C, en espera de ser sometida a la hidrólisis.

### **3.2.2.2. Análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las muestras pretratadas**

Se separaron dos gramos de biomasa de las muestras pretratadas, las cuales fueron lavadas hasta alcanzar un pH neutro. Luego, la biomasa se colocó en una placa Petri y se secó en un horno a 60°C. Una vez seca, se pulverizó y se envió al Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad Católica de Santa María para su análisis posterior.

### **3.2.2.3. Análisis de Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier**

Se analizaron los espectros FT-IR de la biomasa pulverizada antes y después del pretratamiento, a fin de realizar la identificación de los componentes de la biomasa a través de los enlaces de la lignina, hemicelulosa y celulosa (Bronzato et al., 2017). Para ello, un gramo de la biomasa pretratada se separó y lavó hasta llegar a un pH neutro, luego se colocó en una placa Petri y se secó en horno a 60 °C. Para su lectura, 0.5 mg de la biomasa en polvo se granularon con 50 mg de KBr, prensando las muestras a través de una prensa manual hasta alcanzar un espesor de 1 mm. Finalmente, la muestra fue analizada en un equipo FT-IR de marca ThermoScientific.

#### **3.2.2.4. Análisis estadístico del diseño experimental**

A partir de los datos de azúcares reductores obtenidos de los tratamientos experimentales, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para identificar las condiciones que permitieron obtener los resultados óptimos y viables.

#### **3.2.3. Obtención de azúcares reductores mediante hidrólisis ácida**

##### **3.2.3.1. Hidrólisis de la biomasa pretratada**

La hidrólisis se llevó a cabo con la biomasa pretratada, la cual fue sometida a ácido sulfúrico al 3% con explosión a vapor durante 60 minutos a 121 °C (Carreño, 2019; Das et al., 2016b; Ramaraj & Unpaprom, 2019; Ruan et al. 2016).

##### **3.2.3.2. Medición de azúcares reductores del hidrolizado**

Las muestras obtenidas de los 45 tratamientos se filtraron y el líquido se analizó siguiendo el método DNS el cuál es un método colorimétrico que permite determinar la mayor concentración de azúcares y así garantizar una mayor eficiencia en el proceso.

Se utilizó 1 ml de la muestra de hidrolizado para el análisis de DNS. A cada una se le añadieron 0.5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) con el fin de oxidar los azúcares presentes. Luego, las muestras se llevaron a baño maría a 100 °C durante 10 minutos, lo que provocó un cambio de color de amarillo a un tono entre naranja oscuro. Posteriormente, se añadieron 3.5 mL de agua destilada. Finalmente, la lectura se realizó en un espectrofotómetro UV-visible ThermoScientific Genesys 150, a una longitud de onda de 540 nm.

##### **3.2.3.3. Hidrólisis con pretratamiento seleccionado**

La hidrólisis se realizó utilizando la biomasa pretratada del ensayo que presentó las mejores condiciones según el análisis estadístico. Se trabajó por triplicado, empleando 5 gramos de

biomasa pretratada, los cuales fueron sometidos a un tratamiento con ácido sulfúrico al 3% y explosión a vapor durante 60 minutos a 121 °C. (Carreño, 2019; Das et al., 2016b; Ramaraj & Unpaprom, 2019; Ruan et al. 2016).

#### **3.2.3.4. Medición de azúcares reductores con el pretratamiento seleccionado**

Tras completar el proceso de hidrólisis, se llevó a cabo la filtración de la muestra, el filtrado resultante se analizó utilizando el método DNS para cuantificar la concentración de azúcares reductores generados.

### **3.2.4. Obtención de bioetanol a partir de la fermentación del hidrolizado**

#### **3.2.4.1. Activación del inóculo de *S. cerevisiae***

Previo a la etapa de fermentación, se realizó la activación de *S. cerevisiae* a través de un medio de agitación utilizando suero fisiológico en la cocina eléctrica. Luego de ello, se procedió a sembrar la levadura en placas Petri en Agar Soboraud para después permitir su crecimiento en incubadora a 30°C durante 24 horas.

#### **3.2.4.2. Fermentación del hidrolizado**

El hidrolizado fue dispuesto en las botellas de vidrio graduadas de 250 ml para ser inoculadas al 10% v/v de *S. cerevisiae*. Durante el desarrollo de la reacción se controlaron parámetros como temperatura a 30°C, velocidad de agitación a 120 rpm, y un pH equivalente a 5 durante un intervalo de tiempo de 72 horas. La toma de muestras se realizó cada hora extrayendo 2 ml de la muestra cada 24 horas (Das et al., 2016b; Carreño, 2021; Shanab et al., 2018; Zhang et al., 2018).

#### **3.2.4.3. Evaluación de la reducción de azúcares**

Se monitoreo la transformación de azúcares reductores, para ello se utilizó 1 ml de la muestra de hidrolizado para el análisis de DNS. A cada una se le añadieron 0.5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) con el fin de oxidar los azúcares presentes. Luego, las muestras se llevaron a baño maría a 100 °C durante 10 minutos, lo que provocó un cambio de color de amarillo a un tono entre naranja oscuro. Posteriormente, se añadieron 3.5 mL de agua destilada. Finalmente, la lectura se realizó en un espectrofotómetro UV-visible ThermoScientific Genesys 150, a una longitud de onda de 540 nm.

#### **3.2.4.4. Medición de la concentración de bioetanol**

Con la finalidad de determinar la concentración de bioetanol, se procedió a hacer uso del kit de ensayo para bioetanol de MEGAZYME, el cual permitió evaluar la concentración de alcohol de las muestras tomadas a las 24, 48 y 72 horas.

#### **3.2.4.5. Destilación del fermentado**

Al obtener los fermentados, se dispuso a armar el equipo de destilación, las muestras pasaron por una operación de filtración para ser depositadas en el balón de destilación y seguidamente ser calentadas a una temperatura de 75 a 85°C hasta llegar al punto de la condensación.

#### **3.2.5. *Determinación del rendimiento del bioetanol***

Después de la obtención del bioetanol, se calculó el rendimiento del proceso realizado para determinar la cantidad de bioetanol producida por biomasa de jacinto de agua utilizado, así también se determinó el rendimiento volumétrico del bioetanol obtenido a partir del desarrollo experimental.

### 3.2.5.1. Rendimiento volumétrico del bioetanol obtenido

Para el cálculo de bioetanol se tomó en cuenta el estudio de Escalante y Fuentes (2013):

$$Rv = \frac{\text{Volumen de etanol producido (ml)}}{\text{Volumen de fermentado (ml)}} * 100 \quad (5)$$

Donde:

$Rv$  = Rendimiento volumétrico

### 3.2.5.2. Rendimiento en términos de biomasa inicial utilizada

Para la determinación del Rendimiento en términos de biomasa inicial se utilizó la ecuación referida por Malagón (2009):

$$Rbi = \frac{\text{Volumen de etanol producido (ml)}}{\text{Cantidad de biomasa inicial (g)}} \quad (6)$$

Donde:

$Rbi$  = Rendimiento en términos de biomasa inicial



## CAPÍTULO IV

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Determinación de lignina y humedad del Jacinto de Agua (*Eichhornia crassipes*)

#### A. Reporte de Humedad presente en *Eichhornia crassipes*

En esta investigación, se determinó que el jacinto de agua recolectado en los drenajes próximos a las Lagunas de Mejía-Arequipa presenta un promedio de humedad de  $92.45 \pm 0.69\%$ . Este valor es comparable a los resultados obtenidos por Carlini et al. (2018) que indica que el jacinto de agua contiene una humedad equivalente al  $92,28 \pm 0,43\%$ . Así también, Kathirgamanathan et al. (2024), reportaron un contenido de humedad del 90% en la misma especie recolectada de hábitats similares. Estos hallazgos resaltan la capacidad de esta planta acuática para retener agua, lo que puede ser beneficioso para procesos de conversión bioquímica, ya que un mayor contenido de humedad puede facilitar la disponibilidad de azúcares durante la hidrólisis. Además, el estudio de Nigam (2002) situó la humedad del jacinto de agua entre el 91% y el 94%. Estos resultados resaltan la alta capacidad de retención de agua de esta planta, lo que se constituye como un factor crítico a considerar en los procesos de pretratamiento de la biomasa, ya que una humedad elevada puede influir en la eficiencia del proceso de hidrólisis y, por ende, en el rendimiento de bioetanol.

Por otro lado, un estudio reciente de Azwar et al. (2022), que evaluó el contenido de humedad en diferentes tipos de biomasa, encontró que el jacinto de agua presentaba niveles de humedad significativamente más altos en comparación con otras fuentes de biomasa, como la caña de azúcar y los residuos de maíz, que mostraron porcentajes de humedad promedio de 70-80%. Esta diferencia en el contenido de humedad puede estar relacionada con la fisiología y el hábitat de cada planta, ya que el jacinto de agua se desarrolla en ambientes acuáticos y tiene una alta capacidad de absorción.

Es importante mencionar que, el contenido elevado de humedad en el jacinto de agua podría presentar desafíos durante la etapa de almacenamiento y transporte, ya que un mayor contenido de agua puede aumentar el riesgo de descomposición microbiana y afectar la calidad del material. En consecuencia, estudios como el de Smith et al. (2020) sugieren que la reducción del contenido de humedad a niveles óptimos, generalmente por debajo del 15-20% para el almacenamiento a largo plazo, es crucial para mantener la calidad y facilitar el procesamiento de la biomasa.

### B. Caracterización de Lignina en la biomasa de *Eichhornia crassipes*

De acuerdo con los resultados de la caracterización de lignina (Tabla 4) que se hizo para dicha especie, se obtuvo que un 35.28% de la biomasa de jacinto de agua corresponde a lignina.

**Tabla 4.**

*Resultados de caracterización de lignina en la biomasa del jacinto de agua*

	Valor
Lignina insoluble (g)	0.1467
Lignina soluble (g)	0.0014
Lignina total (%)	35.288

*Nota.* Elaboración propia

Existen investigaciones previas sobre el estudio del contenido de lignina en esta especie, como la realizada por Espinoza et al. (2022) que indica que el porcentaje de contenido de lignina en *Eichhornia crassipes* varía entre 2.8% y 32 %. De igual manera, Pintor et al. (2018) reportó valores entre 12.5 y 25.70% de lignina para la misma especie. Otra investigación llevada a cabo por Sharma et al. (2024) obtuvo un porcentaje de lignina de  $10.1 \pm 0.25$  %. Sin embargo, el valor de nuestro estudio supera el porcentaje reportado de dichas investigaciones. El estudio de Botinno

et al. (2021) presenta un porcentaje de  $35.0 \pm 6.0\%$  de lignina, dicho resultado es similar al reportado en esta investigación. Asimismo, dicho estudio presenta reportes de porcentajes de lignina para otras plantas acuáticas flotantes como *P. stratiotes* con  $28.6 \pm 1.2\%$  y *S. auriculata*  $49.0 \pm 1.3\%$ . Las variaciones del porcentaje de lignina reportadas por estos estudios pueden estar relacionadas a factores como las condiciones de cosecha, la localización geográfica del crecimiento, el entorno, la madurez de la planta, así como la calidad fisicoquímica del agua (Espinoza et al., 2022; Sharma et al., 2024).

La producción de biocombustibles a partir de materiales celulósicos depende en gran medida de la alteración de su compleja estructura lignocelulósica, en ese sentido, se debe seleccionar un método de pretratamiento adecuado que permita reducir el contenido de lignina. Actualmente, se investigaron varios tipos de métodos de pretratamiento, incluidos los pretratamientos ácidos, alcalinos, microondas, agua caliente líquida y compuestos (Zhang et al., 2016), por ello, esta investigación ha considerado un pretratamiento alcalino con NaOH a diferentes concentraciones a fin de potenciar la eliminación de la lignina.

## **4.2. Establecimiento de condiciones experimentales de pretratamiento alcalino**

### **4.2.1. Resultados del diseño experimental de la etapa de pretratamiento**

A partir del diseño experimental basado en un diseño Box Behnken con tres puntos centrales, se presentan los resultados de las condiciones experimentales evaluadas en el pretratamiento de la biomasa que se encuentra detallado en la Tabla 5.

**Tabla 5.**

*Concentración de azúcares reductores después de hidrólisis*

N°	Concentración de NaOH (%)	Tiempo de pretratamiento (min)	Tamaño de partícula (µm)	Cantidad de azúcares reductores (g/L)
1	1	45	200	2.009
2	1	15	200	2.231
3	2	30	200	1.887
4	1	30	250	2.681
5	3	30	250	1.122
6	2	45	250	1.844
7	3	30	150	1.086
8	3	15	200	0.828
9	2	15	150	1.315
10	3	45	200	0.936
11	2	30	200	1.758
12	2	15	250	0.987
13	2	45	150	1.201
14	1	30	150	2.923
15	2	30	200	1.408
16	1	45	200	2.181
17	1	15	200	2.452
18	2	30	200	1.721
19	1	30	250	2.510
20	3	30	250	1.157
21	2	45	250	1.772
22	3	30	150	1.093
23	3	15	200	0.700
24	2	15	150	1.329
25	3	45	200	1.043
26	2	30	200	1.508
27	2	15	250	1.072
28	2	45	150	1.444
29	1	30	150	3.010
30	2	30	200	1.801
31	1	45	200	2.202
32	1	15	200	2.052
33	2	30	200	1.873

34	1	30	250	2.704
35	3	30	250	1.372
36	2	45	250	1.811
37	3	30	150	1.086
38	3	15	200	0.914
39	2	15	150	1.623
40	3	45	200	1.050
41	2	30	200	1.472
42	2	15	250	1.100
43	2	45	150	1.287
44	1	30	150	3.032
45	2	30	200	1.801

*Nota.* Elaboración propia

En base a la experimentación ejecutada, se observa en la Tabla 5 que el mejor ensayo corresponde a condiciones de NaOH a una concentración del 1%, tiempo de pretratamiento de 30 minutos y un tamaño de partícula de 150  $\mu\text{m}$  donde se obtuvo un valor máximo de 3.010 g/L. El ensayo que menor producción de azúcar obtuvo fue a condiciones de NaOH a una concentración del 3%, un tiempo de 15 min y un tamaño de partícula de 200  $\mu\text{m}$  donde se obtuvo un valor mínimo de 0.571 g/L.

La producción de bioetanol involucra varias etapas, como el pretratamiento, la hidrólisis, la fermentación y la destilación. La primera etapa, que busca mejorar el rendimiento de las materias primas, consiste en la implementación de pretratamientos que aumenten la accesibilidad a los componentes de la biomasa. Estos procedimientos pueden disminuir el costo asociado a la conversión de la biomasa celulósica en azúcares reductores fermentables (Jelani et al., 2023). Además, factores como el tiempo, la concentración de los reactivos químicos y la temperatura juegan un papel importante en el pretratamiento, por lo que optimizar estos parámetros es esencial para lograr una producción eficiente de bioetanol (Shafaei et al., 2023). Según el estudio de Dai et al. (2021), demostró que pretratamiento térmico y la explosión de vapor logran extraer más lignina que el ácido sulfúrico. Además, determinó que el pretratamiento alcalino tiene un impacto

significativo en la deslignificación y modificación de la lignina, mientras que los ácidos afectan mayormente la celulosa y la hemicelulosa, por esta razón es que en esta investigación se realizó el pretratamiento con hidróxido de sodio.

#### **4.2.2. Análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las muestras pretratadas**

Para observar el comportamiento de la morfología de la biomasa bajo los pretratamientos con hidróxido de sodio que generaron mayor y menor generación de azúcares reductores se realizó un análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) en la Universidad Católica de Santa María, cuyo laboratorio especializado utilizó un microscopio electrónico de barrido modelo EVO 10MA CARL ZEISS. La obtención de imágenes se realizó utilizando el software SmartSEM ZEISS operó con una tensión de aceleración de 10 kV y una tensión de trabajo a distancia de 5-10 mm.

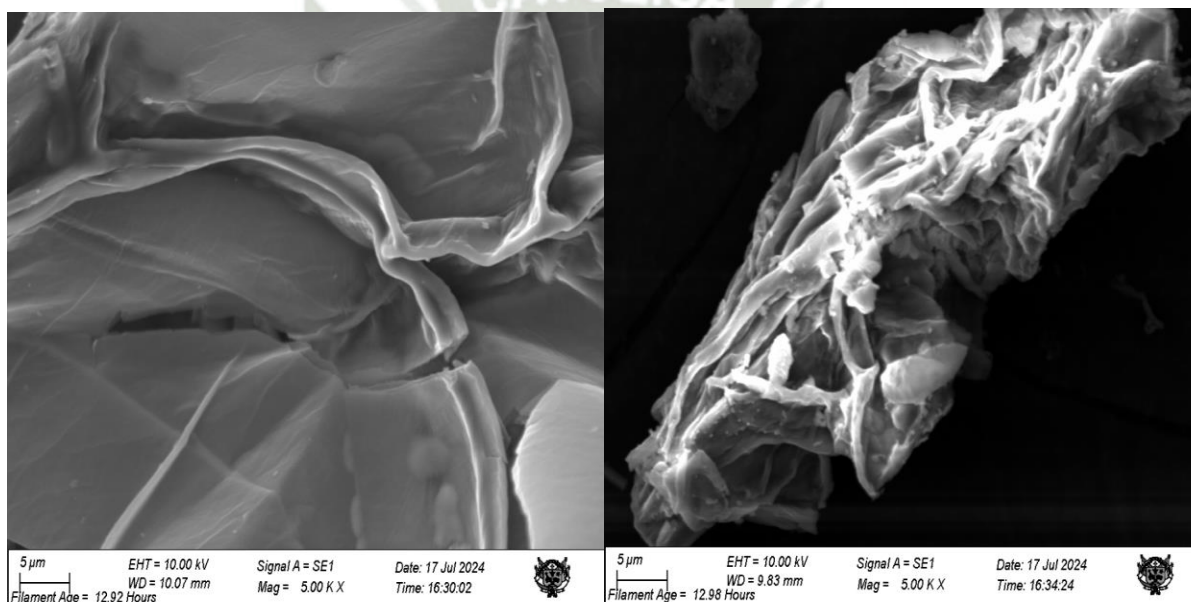
Esta técnica es utilizada en diferentes áreas de investigación y se aplica ampliamente en el estudio de la estructura y morfología de superficies, a través de la adquisición de imágenes de alta resolución de la superficie de la muestra. Según Codoche & López (1989), es la mejor técnica para la determinación de la distribución del tamaño de partícula. No obstante, el SEM presenta algunas limitaciones en la preparación de la muestra, la cual debe cumplir con requisitos como ser amigable con el vacío, y tener una capa superficial conductora de electricidad. En ese sentido, dependiendo de las características del material a analizar, se deben realizar con antelación procedimientos específicos como la cobertura de muestras no conductoras o poco conductoras con una capa delgada de carbono o metal. Por lo tanto, la preparación de la muestra juega un papel crucial en la calidad de los resultados.

La Figura 1a expone la morfología de la plántula sin tratamiento alguno, en la misma se observa que las superficies de las muestras son lisas, continuas y sin poros lo que, puede sugerir la presencia de la lignina sobre las fibras, mientras la Figura 1b muestra a la plántula con el mejor

tratamiento que generó la mayor cantidad de azúcares reductores, al comparar ambas imágenes se evidencia un cambio en la superficie de la plántula después de un pretratamiento con NaOH que es causado por la reacción del hidróxido con enlaces éster que conduce a la solubilización de la lignina y liberaciones de celulosa.

### Figura 5.

*Imagen SEM sin pretratamiento (izquierda), imagen SEM después del pretratamiento a condiciones de NaOH 1% y tiempo de pretratamiento de 30 minutos (derecha).*



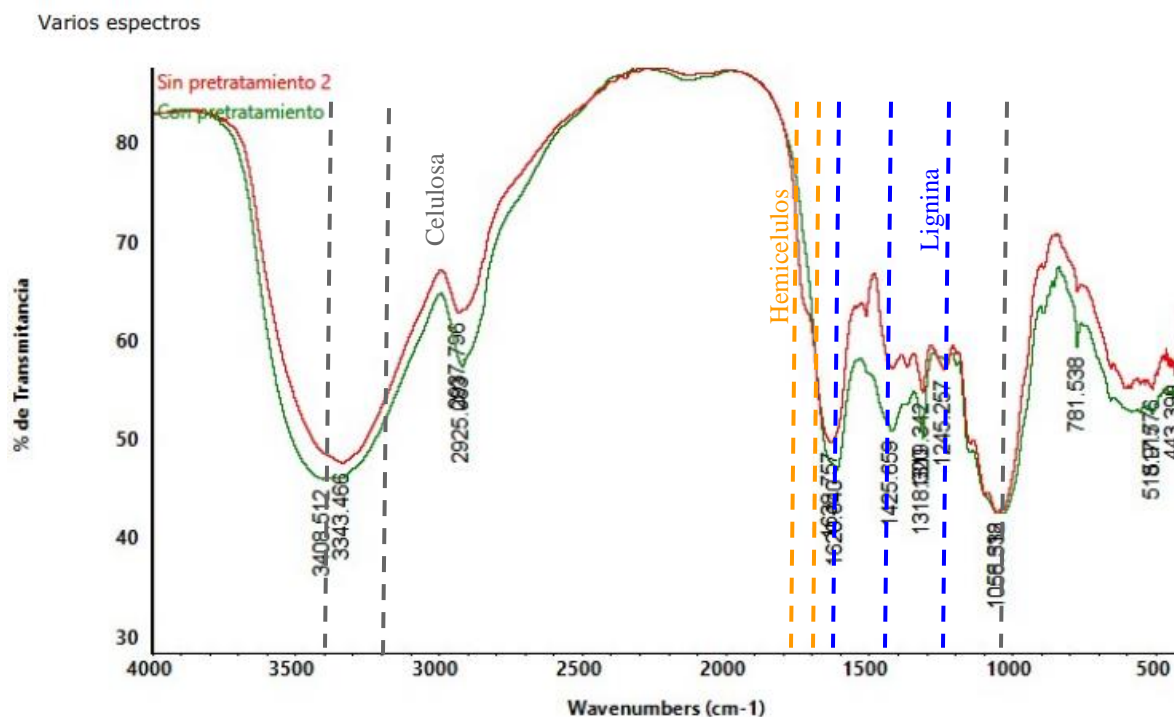
*Nota.* Imágenes obtenidas del microscopio electrónico de barrido producto del análisis SEM

#### 4.2.3. Análisis de Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

A través de imágenes FTIR se identificaron los componentes de la biomasa a través de los enlaces de la lignina, hemicelulosa y celulosa, en donde se identifican los picos correspondientes a los grupos funcionales.

**Figura 6.**

*Espectros infrarrojos por transformada de Fourier comparando biomasa de muestra con pretratamiento y sin pretratamiento.*



*Nota.* Imagen obtenida del análisis FTIR de la biomasa pretratada.

Se realizó un análisis de FTIR en donde se analizaron los picos entre las bandas 400 y 4000 cm<sup>-1</sup>. Según Bronzato et al. (2017) reportaron que las bandas pertenecientes a los enlaces químicos de la celulosa son 3400–3200 cm<sup>-1</sup> y 1050 cm<sup>-1</sup>, la hemicelulosa está indicada por la banda 1765–1715 cm<sup>-1</sup>, y la lignina está indicada por 3 enlaces referidos a las bandas: 1270 cm<sup>-1</sup>, 1430–1470 cm<sup>-1</sup> y 1450-1630 cm<sup>-1</sup>. Para el análisis de los componentes de la biomasa, se trazaron líneas punteadas que corresponden a las bandas pertenecientes a la celulosa en color plomo, la hemicelulosa en anaranjado y la lignina en color azul. Como se observa en la Figura 2, hay cambios en los picos de los grupos funcionales correspondientes a la lignina y celulosa.

Se ha demostrado que el pretratamiento alcalino con NaOH mejora la digestibilidad de la celulosa, ya que el NaOH rompe los enlaces éster y éter presentes en la lignina, facilitando su solubilización

y eliminación parcial, lo que deja expuestas las fibras de celulosa y hemicelulosa. Además, el álcali residual puede recuperarse y reutilizarse mediante procesos de reciclaje o recuperación química (Shafaei et al., 2023).

#### 4.2.4. Análisis estadístico

Se ha reportado que, en el campo de la investigación para la producción de bioetanol, la Metodología de Superficie de Respuesta utilizando un diseño Box-Behnken, es una herramienta ampliamente utilizada en la optimización del pretratamiento de la biomasa seca la cual es materia de estudio, a razón de que considera diferentes variables lo que permite determinar las mejores condiciones de reacción que conducen a una liberación óptima de azúcares en comparación con otros diseños. En la presente investigación, se optó por trabajar el Diseño Experimental anteriormente referido, el cual, según lo descrito en la metodología, trabajó en base a 45 ensayos en los que se sometió 0.5 gramos de la biomasa de *E. Crassipes* a diferentes concentraciones de NaOH e intervalos de tiempo. A continuación, se presenta el análisis estadístico del diseño experimental Box Behnken:

**Tabla 6.**

*Análisis de Varianza ANNOVA*

Model	2.37	9	0.2628	78.95	< 0.0001	significante
<b>A-[NaOH]</b>	1.91	1	1.91	573.77	< 0.0001	
<b>B-Tiempo de pretratamiento</b>	0.0427	1	0.0427	12.84	0.0010	
<b>C-Tamaño de partícula</b>	0.0001	1	0.0001	0.0165	0.8984	
<b>AB</b>	0.0150	1	0.0150	4.52	0.0407	
<b>AC</b>	0.0205	1	0.0205	6.17	0.0179	
<b>BC</b>	0.1006	1	0.1006	30.22	< 0.0001	

<b>A<sup>2</sup></b>	0.0359	1	0.0359	10.79	0.0023	
<b>B<sup>2</sup></b>	0.2188	1	0.2188	65.72	< 0.0001	
<b>C<sup>2</sup></b>	0.0036	1	0.0036	1.07	0.3079	
<b>Residual</b>	0.1165	35	0.0033			
<b>Lack of Fit</b>	0.0275	3	0.0092	3.29	0.0331	Significante
<b>Pure Error</b>	0.0890	32	0.0028			
<b>Cor Total</b>	<b>2.48</b>	<b>44</b>				

*Nota.* Elaboración propia

La tabla 6 presenta el análisis de varianza (ANOVA), donde se concluye que la concentración de hidróxido de sodio y el tiempo de pretratamiento tienen un impacto significativo en la obtención de azúcares reductores. Este resultado es consistente con otros estudios que han demostrado cómo los pretratamientos alcalinos, como el uso de NaOH, favorecen la eliminación de lignina, lo que facilita el acceso a los carbohidratos durante la hidrólisis.

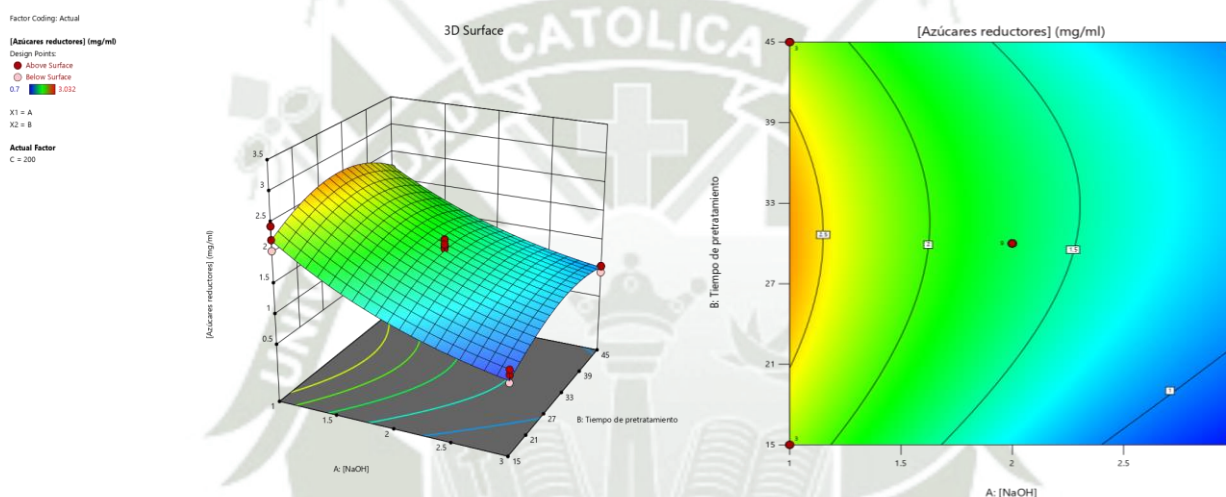
Por otro lado, el análisis muestra que el tamaño de partícula no tiene un efecto significativo dado que su valor de p es equivalente a 0.8984. Esto sugiere que, en los tamaños de partícula evaluados, reducir o aumentar el tamaño de la biomasa no contribuye de manera relevante a mejorar la disponibilidad de azúcares.

Del análisis, se desprende que, el uso de hidróxido de sodio junto con el tiempo de explosión a vapor resultó ser lo suficientemente agresivo para desintegrar las estructuras lignocelulósicas de la biomasa sin que el tamaño de partícula influyera de manera significativa. Es decir, la reacción del NaOH diluido ocurrió con similar efectividad en las partículas de distintas granulometrías, lo que provocó resultados uniformes en cuanto a la liberación de azúcares reductores. Estos resultados coinciden por lo mencionado en el estudio de Jongmeesuk et al. (2014), donde, a raíz

de la ejecución de un pretratamiento con el mismo reactivo se desprendió que el hidróxido de sodio provocó hinchazón en la superficie interna de los materiales lignocelulósicos y además, disminuyó el grado de polimerización, cristalinidad y alteración de la estructura de la lignina, generando así mayor producción de azúcares reductores.

**Figura 7.**

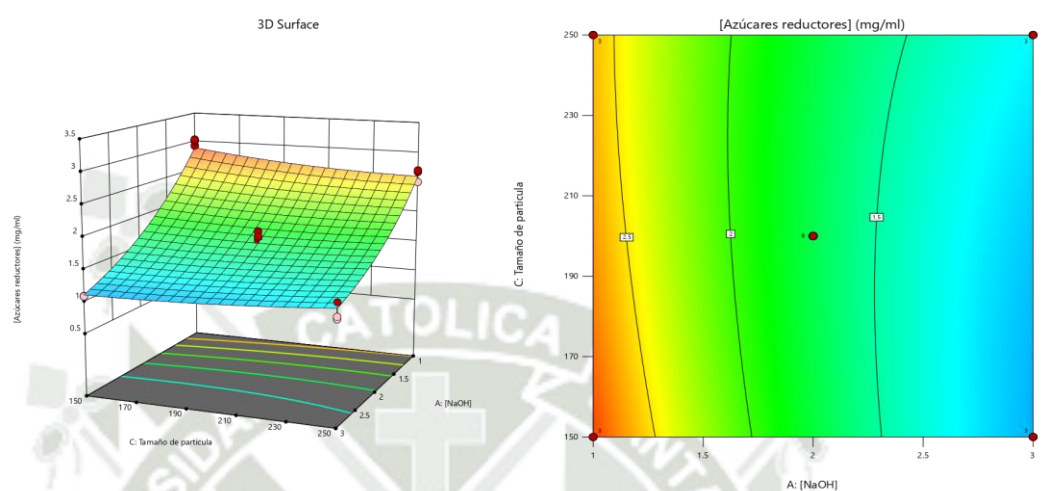
*Gráfica de Superficie 3D y contorno de las variables Concentración de NaOH y Tiempo de pretratamiento*



*Nota.* Obtenida del programa estadístico Design Expert

**Figura 8.**

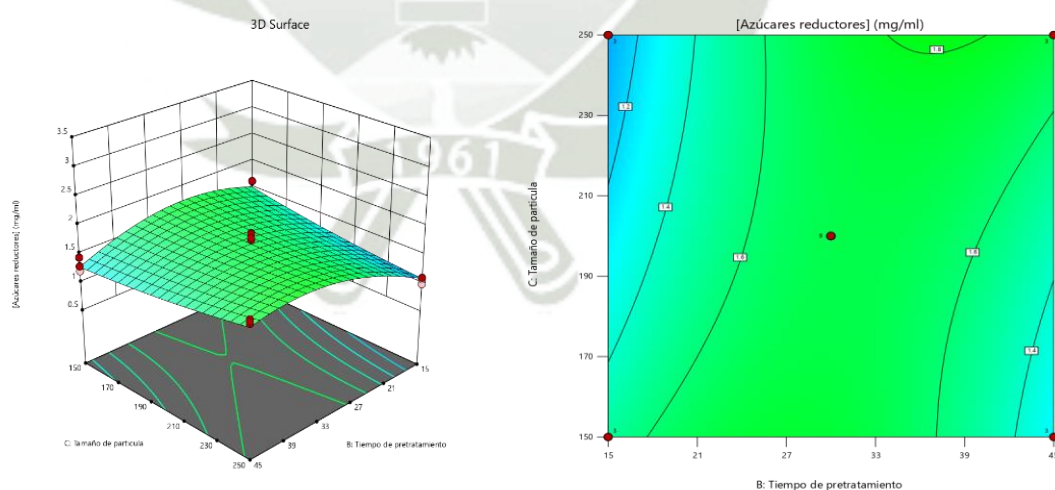
*Gráfica de Superficie 3D y contorno de las variables Concentración de NaOH y Tamaño de partícula*



*Nota.* Obtenida del programa estadístico Design Expert

**Figura 9.**

*Gráfica de Superficie 3D y contorno de las variables Tiempo de pretratamiento y Tamaño de partícula*



*Nota.* Obtenida del programa estadístico Design Expert

La gráfica de la Figura 7, evidencia que al tener una superficie curva o con pendiente, la variable dependiente, que es la concentración de azúcares reductores está siendo influenciada por la concentración de hidróxido, así como el tiempo de explosión a vapor sometido en autoclave. La cúspide o valle máximo local, así como la superficie inclinada muestra que a una concentración de NaOH al 1% y un tiempo de pretratamiento de 30 min, se obtiene una alta concentración de azúcares reductores lo que también indica una interacción significativa entre ambos factores. Por el contrario, el valle mínimo local indica que a una concentración de NaOH al 3% y un tiempo de pretratamiento de 45 minutos, se obtiene una concentración de azúcares mínima. Asimismo, dicha información se confirma con la gráfica de contorno, por las líneas curvadas, por lo que se concluye que hay una interacción significativa entre los factores.

El análisis experimental confirma que la concentración de hidróxido de sodio (NaOH) utilizada durante el pretratamiento de la biomasa de jacinto de agua tuvo un impacto significativo en la producción de azúcares reductores. En específico, el ensayo con concentración de 1% de NaOH evidenció una mayor liberación de estos azúcares, lo que sugiere que, a esta concentración, se logra un equilibrio óptimo entre el procesamiento de las estructuras lignocelulósicas y la preservación de los azúcares necesarios para los siguientes procesos. Este hallazgo coincide con estudios realizados con anterioridad, donde se concluyó que, a concentraciones moderadas de NaOH se mejora la eficiencia de la liberación de azúcares sin generar subproductos inhibidores que afectan la fermentación (Eshtiaghi et al., 2012).

Por otro lado, en la gráfica de la Figura 8 y 9, se muestran que, al tener una superficie plana, la concentración de azúcares reductores no está siendo influenciada por el tamaño de partícula de la biomasa. No obstante, la cúspide o valle máximo local que se muestra en cada figura pone en conocimiento que a una concentración de NaOH al 1% y un tiempo de 30 minutos respectivamente,

se obtiene una alta concentración de azúcares reductores considerando un tamaño de partícula de 150  $\mu\text{m}$ . Esto se observa también en las gráficas de contorno de ambas figuras, en las cuales se observan líneas paralelas, es decir; no hay una interacción significativa entre los factores.

Con relación a la Figura 8 se concluye que el efecto de la concentración de NaOH en la concentración de azúcares reductores no depende del tamaño de la partícula, es decir que el factor del tamaño de la partícula no está influyendo significativamente en la respuesta. Sin embargo, la concentración de NaOH si tiene un efecto significativo sobre la producción de azúcares reductores. A menor concentración de hidróxido, la concentración de azúcares reductores es mayor, pero considerando que mientras aumenta el tamaño de partícula, la concentración de azúcares reductores disminuye levemente. La investigación de Dai et al. (2021) menciona que al aumentar la concentración de álcali, las estructuras fibrosas se hinchan debido a que el NaOH permanece dentro de las microfibras, volviéndose pegajosas y rígidas, lo que incrementa tanto la superficie como el tamaño de los poros.

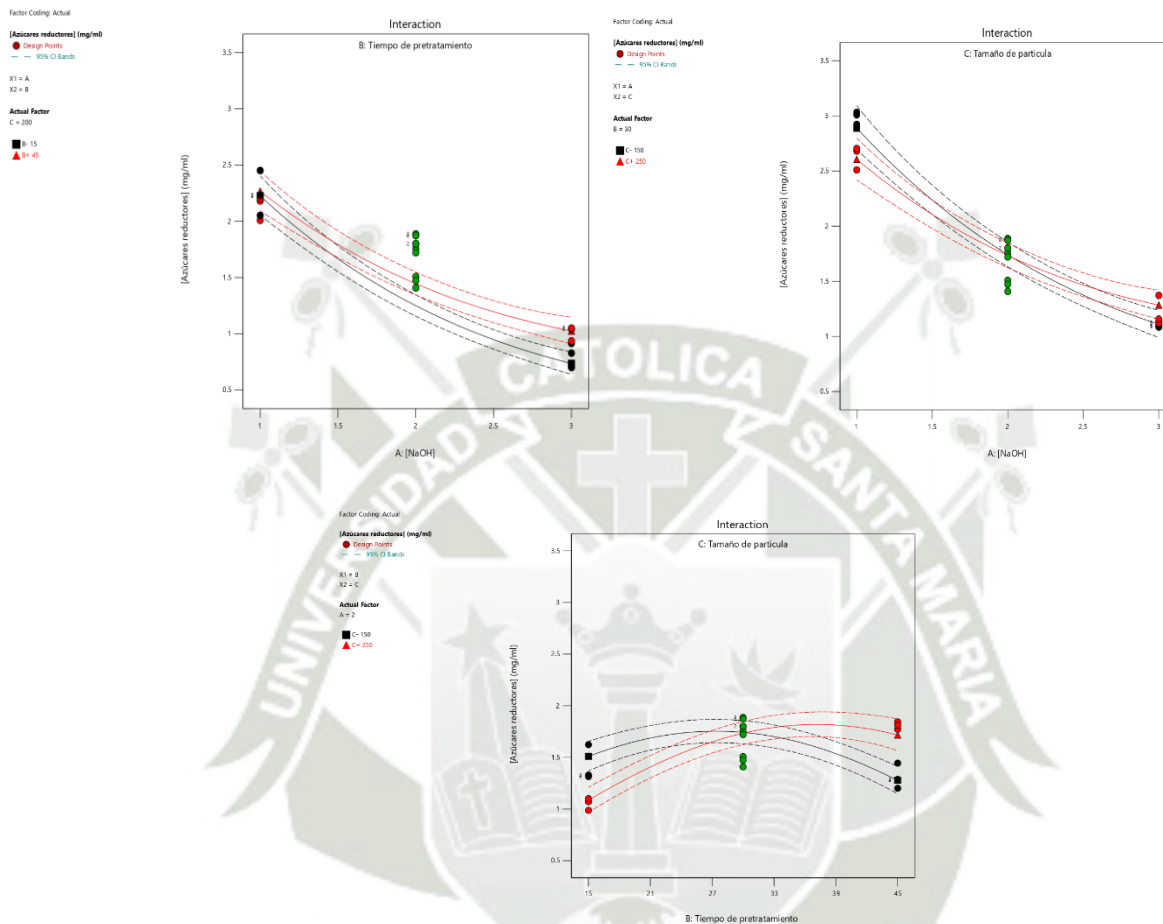
En el caso de la Figura 9, se observa que el efecto del tiempo de pretratamiento en la concentración de azúcares reductores no depende del nivel del tamaño de la partícula. Sin embargo, el tiempo de pretratamiento si tiene un efecto significativo sobre la producción de azúcares reductores. Se concluye que las concentraciones más bajas de azúcares reductores se alcanzan con partículas de 150  $\mu\text{m}$  tras un pretratamiento de 45 minutos, de igual manera que partículas de mayor tamaño (más de 150  $\mu\text{m}$ ) en un pretratamiento de 15 minutos. Esto sugiere que un tamaño de partícula menor combinado con un tiempo más prolongado podría provocar no solo la pérdida de lignina, sino también de azúcares reductores. En cambio, las partículas más grandes, con un tiempo de tratamiento más corto, no lograrían romper los enlaces necesarios para liberar dichos azúcares.

En el proceso de producción de bioetanol, la reducción de tamaño y el pretratamiento de la biomasa seca se realizan antes del proceso de hidrólisis, esto debido a que la biomasa fresca no puede ser sometida a procesos de conversión de bioetanol de manera eficiente. En diversos estudios se han reportado correlaciones positivas donde el tamaño de partícula de mayor granulometría tiende a mejorar la hidrólisis, en otras evaluaciones experimentales, se han reportado correlaciones insignificantes respecto al tamaño de partícula y finalmente, se ha evidenciado que el tamaño de partícula con menor granulometría aumenta la eficiencia en la producción de azúcares reductores. Los hallazgos obtenidos en esta investigación coinciden con los reportados por Yang et al. (2023), quienes concluyeron que las partículas de tamaño inferior a  $250 \mu\text{m}$  favorecen una mayor eficiencia en la producción de azúcares reductores. Además, la reducción del tamaño de las partículas genera un aumento en el área superficial específica, lo que a su vez disminuye el tiempo de digestión y el grado de polimerización, resultando en un mayor rendimiento del proceso de hidrólisis.

En relación con la concentración de hidróxido de sodio, el estudio realizado por Córdoba et al. (2014), se analizan las concentraciones de hidróxido en rastrojo de piña concluyendo que, un incremento en la concentración de hidróxido de sodio genera una degradación irreversible de la celulosa, lo que resulta en la pérdida de esta en los procesos de lavado del material.

**Figura 10.**

*Gráficas de interacción de variables durante el pretratamiento*



*Nota.* Las gráficas representan (a) Relación concentración de NaOH y tiempo de pretratamiento (b) Relación de concentración de NaOH y tamaño de la partícula (c) tiempo de pretratamiento y tamaño de la partícula. Obtenidas del programa estadístico Design Expert.

El Modelo de Superficie de Respuesta es conocido como un método estadístico útil debido a su constante aplicación para la optimización de parámetros complejos en varios procesos biológicos y químicos. De los resultados obtenidos a partir del análisis del diseño experimental planteado, la Figura 10 muestra el efecto del tiempo de pretratamiento y la concentración de hidróxido de sodio, donde se desprende que, a una baja concentración de hidróxido de sodio, el aumento del tiempo

de pretratamiento a 30 minutos generó en un fuerte aumento en la concentración de azúcares reductores. Además, un largo tiempo de pretratamiento (45 minutos) resultó en una baja concentración de azúcares reductores debido al aumento de la concentración de hidróxido de sodio (3%). La temperatura del proceso de explosión a vapor fue a 121 °C fue la misma que la investigación de Harun & Danquah (2011), quienes informaron que a temperaturas superiores a 200 °C han se genera una disminución significativa en la cantidad de azúcares fermentables liberados. Esto ocurre porque los azúcares complejos son directamente solubles a altas temperaturas, lo que distorsiona su formación de equilibrio (Shafei et al. 2024).

Como se ha venido mencionado, existe evidencia suficiente que demuestra la acción efectiva del pretratamiento alcalino con NaOH debido a que su acción durante el proceso de pretratamiento facilita la eliminación de la lignina, aumentando la accesibilidad del ácido sulfúrico diluido hacia los polímeros de celulosa y hemicelulosa (Kumar et al., 2020). No obstante, la eficacia del pretratamiento también depende del tiempo de exposición al vapor dado que, esta variable suplementa la acción del NaOH al promover la disrupción física de las paredes celulares del Jacinto de Agua, permitiendo así una mayor inserción del hidróxido de sodio en las estructuras internas de la biomasa (Chen et al., 2021).

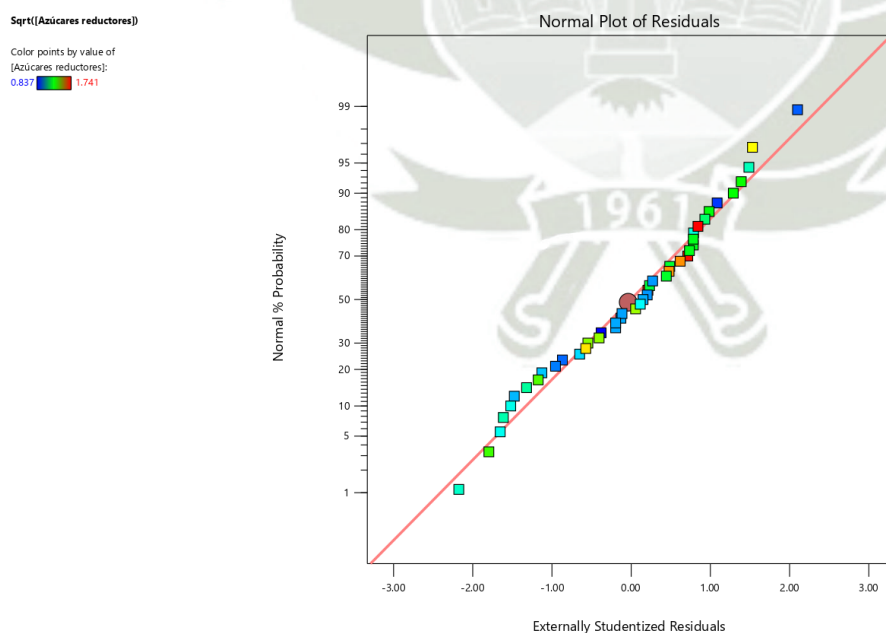
Los resultados del diseño experimental advierten los hallazgos reportados por García-Martín et al. (2019), donde se hace alusión a que los tiempos moderados de explosión a vapor, en combinación con agentes alcalinos, maximizan la disolución de la lignina sin generar subproductos inhibidores que puedan interferir en las etapas posteriores de la fermentación.

Además, la interacción entre ambos parámetros fue evidente al comparar concentraciones mayores de NaOH y tiempos de vapor prolongados, esto a razón de que, la menor concentración de azúcares

reductores se obtuvo a condiciones de NaOH al 3% y con un tiempo de 45 minutos. Al realizar la comparación con otros estudios, se encuentra una divergencia en los resultados, en vista de que autores como Zhang et al. (2022) han sugerido que, a concentraciones más altas de NaOH combinadas con tiempos prolongados, también libera una cantidad significativa de azúcares reductores, sin embargo, se reconoce que este procedimiento arriesga a la biomasa a la formación de subproductos, como furfural y ácido acético, los cuales reducen la eficiencia del proceso de obtención de bioetanol. En ese sentido, se refuerza la idea de que el equilibrio entre los parámetros de concentración de NaOH y tiempo de vapor es crucial para evitar la sobreexposición y mantener un ambiente favorable para la conversión de azúcares. Este balance permite una liberación de azúcares reductores significativa sin generar subproductos que puedan inhibir el rendimiento de la obtención del bioetanol.

**Figura 11.**

*Gráfica normal de los residuos*

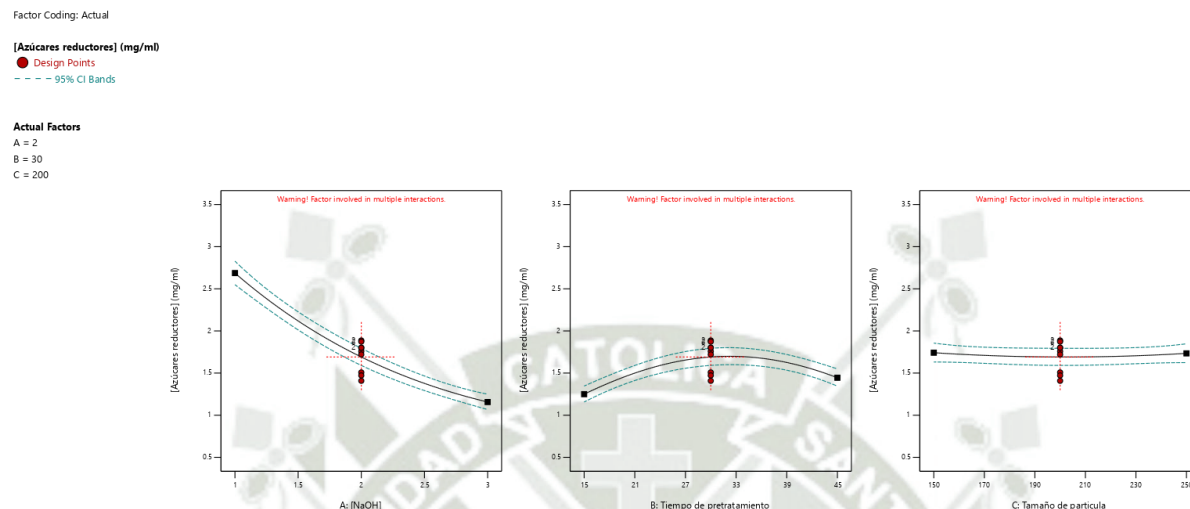


*Nota.* Obtenida del programa estadístico Design Expert

La gráfica normal de los residuos es una herramienta estadística que se usa para verificar si los residuos se distribuyen normalmente. A partir de la figura 11, se observa que los puntos se alinean de manera cercana a la línea recta lo que indica que los residuos están siguiendo una distribución normal. Este comportamiento es crucial, ya que la normalidad de los residuos es un supuesto clave en el análisis ANOVA necesario para asegurar la validez y precisión de los resultados obtenidos. No obstante, en el análisis de la figura, se presencia puntos extremos fuera de la línea recta lo que podría ser un indicio de la existencia de valores atípicos que puedan distorsionar el ajuste del modelo o su capacidad predictiva y, pese a la identificación de un valor atípico, este no altera significativamente la confiabilidad del modelo, ya que su presencia no distorsiona el patrón general de normalidad en los residuos. Según lo reportado por Montgomery (2019), un valor atípico ocasional puede considerarse tolerable si no influye de manera sustancial en los supuestos clave del modelo, como la homocedasticidad o la independencia de los residuos, en su estudio se afirma que mientras los datos generales mantienen su alineación y el valor atípico no afecta de manera significativa los parámetros estadísticos, el ajuste del modelo y las inferencias derivadas de él siguen siendo confiables.

**Figura 12.**

*Gráfica de efectos principales*



*Nota.* Obtenida del programa estadístico Design Expert

Finalmente, la figura 12 muestra los efectos principales de los factores evaluados en el pretratamiento de la biomasa. De acuerdo con la curvatura observada en la gráfica, se puede concluir que tanto la concentración de NaOH como el tiempo de pretratamiento presentan un efecto pronunciado sobre la producción de azúcares reductores. Como se ha mencionado líneas anteriores, este comportamiento es consistente con otros estudios recientes, en los que se ha demostrado que, trabajar el pretratamiento a menores concentraciones de hidróxido de sodio, se incrementa la ruptura de las paredes celulares de la biomasa, lo que facilita la liberación de azúcares simples durante el proceso de hidrólisis (Khan et al., 2019). Por otro lado, la curva observada en la gráfica refleja que un tiempo de 30 minutos es óptimo para maximizar la concentración de azúcares reductores. Estos resultados coinciden con trabajos previos que identifican un tiempo de pretratamiento intermedio como el más efectivo, ya que tiempos

demasiado cortos no permiten una ruptura celular adecuada, mientras que tiempos demasiado largos podrían inducir la formación de subproductos inhibidores (Kumar et al., 2020).

Finalmente, en cuanto al tamaño de la partícula, la gráfica evidencia que este factor no tiene un efecto significativo en la obtención de azúcares reductores. Esto puede atribuirse a que el tamaño de la partícula no influye de manera crítica en la accesibilidad de los reactivos durante el pretratamiento, o que las diferencias entre tamaños no son lo suficientemente grandes para provocar un impacto notable en la liberación de azúcares (Li et al., 2019). Este resultado sugiere que, en este caso, el control estricto del tamaño de la partícula no sería un factor determinante en el diseño experimental, permitiendo centrarse más en la optimización de los otros dos factores principales.

### 4.3. Obtención de azúcares reductores mediante hidrólisis ácida

#### 4.3.1. Resultados de la medición de azúcares reductores

Los resultados obtenidos a partir de la hidrólisis ácida de la biomasa pretratada de *Eichhornia crassipes* confirman su aptitud como materia prima para la obtención de azúcares reductores. El proceso de hidrolizado con ácido sulfúrico diluido al 3% permitió alcanzar una concentración promedio de 4.530 g/L de azúcares reductores (Tabla 7), lo que demuestra la efectividad del método bajo las condiciones experimentales ejecutadas.

**Tabla 7.**

*Cuantificación de azúcares reductores posterior a la hidrólisis ácida diluida de la biomasa*

	1	2	3	Promedio (g/L)	Desviación estándar (g/L)
<b>Azúcares reductores (g/L)</b>	4.535	4.545	4.510	4.530	0.014

*Nota.* Elaboración propia

Este hallazgo es consistente con estudios previos cuyo proceso de hidrólisis ha utilizado reactivos ácidos para maximizar la liberación de monómeros de azúcar a partir de biomasa lignocelulósica (Zhao et al., 2020; Kumar et al., 2021). En ese sentido, investigaciones como la de Offei et al. (2018) mencionan la aplicación de dos tipos de hidrólisis ácida: diluida y concentrada para obtener bioetanol, la primera se realiza a alta temperatura y presión, facilitando el procesamiento continuo de la biomasa, por el contrario, la hidrólisis ácida concentrada requiere condiciones suaves con un tiempo de reacción más largo precisando que, durante el proceso de hidrólisis, la fracción de hemicelulosa se despolimeriza a una temperatura menor que la fracción celulósica.

En particular, el uso de ácido sulfúrico ha sido ampliamente reportado por su capacidad para romper enlaces entre la celulosa y la hemicelulosa, facilitando el acceso a los polímeros de azúcar que pueden ser convertidos posteriormente en bioetanol (Geng, 2020). Así también, se ha citado en investigaciones como la Roni et al. (2019) que, el ácido sulfúrico resulta ser mejor catalizador que el ácido clorhídrico (HCl) para la degradación de la xilosa. Por ello, en la presente investigación, se optó por utilizar ácido sulfúrico diluido a una concentración del 3%, este reaccionó con la biomasa pretratada con explosión a vapor en autoclave manteniendo una temperatura de 121°C durante 60 minutos para garantizar la hidrólisis de la hemicelulosa a xilosa y otros azúcares seguido de la descomposición de la xilosa en furfural. Sin embargo, autores como Lee & Yu (2020), han advertido que debido a la alta temperatura y presión a la que se somete a la biomasa, una gran parte de los azúcares se degradan y no son fermentables por lo que resulta imprescindible mantener un constante control de los parámetros referidos a fin de garantizar una liberación de azúcares eficiente para el siguiente proceso.

**Tabla 8.**

*Concentración de azúcares reductores obtenidos a partir de plantas acuáticas*

<b>Planta acuática utilizada</b>	<b>Azúcar reductor</b>	<b>Metodología utilizada</b>
<i>Pistia stratiotes</i>	200-300 mg/g <sup>1</sup> 600 mg/g	Pretratamiento ácido Pretratamiento ácido e hidrólisis enzimática
<i>Pistia stratiotes L.</i>	199 mg/g <sup>2</sup>	Pretratamiento Alcalino/Oxidativo e hidrólisis enzimática
<i>Eichhornia crassipes</i>	108 mg/g <sup>2</sup>	Pretratamiento Alcalino/Oxidativo e hidrólisis enzimática
<i>Salvinia auriculata</i>	65 mg/mg <sup>3</sup>	Pretratamiento hidrotermal y de explosión de vapor
<i>Eichhornia crassipes</i>	107 mg/g <sup>4</sup>	Pretratamiento alcalino e hidrolisis ácida

*Nota.* Valores de concentración de azúcares reductores tomado de investigaciones realizadas por (1) Jelani et al. (2015), (2) Soda et al., 2013, (3) Trejo et al. (2022) y (4) Esta investigación.

El volumen promedio de hidrolizado obtenido a partir de las condiciones experimentales propuestas fue 116.33 ml, junto con la concentración de azúcares reductores, da lugar a una producción promedio total de 526.98 miligramos de azúcares reductores. Al comparar la concentración de azúcares reductores obtenida del jacinto de agua con otras plantas acuáticas (Tabla 8), como *Pistia stratiotes*, *Eichhornia crassipes* y *Salvinia auriculata* que lograron concentraciones de azúcares reductores de 200-300 mg/g, 108 mg/g y 65 mg/g, respectivamente, se observa que, *Pistia stratiotes* reportó la mayor concentración de azúcares reductores sometiendo a la biomasa a un pretratamiento ácido térmico y una hidrólisis enzimática utilizando un cóctel de enzimas comerciales del kit de biomasa de Novozymes (Jelani et al., 2015), los cuales son procesos que requieren mayor inversión económica a diferencia de los procesos utilizados en

esta presente investigación. Si bien, el jacinto de agua presentó una concentración moderada de 107 mg/g, esta debe ser considerada como fuente de energía renovable debido a su disponibilidad y crecimiento rápido contrastado con cultivos agrícolas. Por otro lado, la especie *Salvinia auriculata* tiene el valor más bajo ya que llevó a cabo un pretratamiento hidrotermal con agua destilada en autoclave a 121°C y una hidrólisis enzimática con celulasa comercial (Trejo et al., 2022). No obstante, resulta importante que investigaciones futuras se enfoquen en la optimización de los procesos de pretratamiento e hidrólisis a fin de aumentar la eficiencia en la liberación de azúcares fermentables.

Dicha optimización podría estar relacionada al uso de pretratamientos más agresivos, la aplicación de hidrólisis enzimática u otras técnicas que permitan romper de manera más eficiente las paredes celulares de esta planta acuática. De este modo, se podría alcanzar un rendimiento de azúcares reductores más competitivo frente a otras especies de plantas acuáticas, lo que posicionaría al Jacinto de agua como un recurso para la producción sostenible de bioetanol.

El tratamiento ácido térmico es una técnica ampliamente utilizada por su costo más accesible en comparación con los tratamientos biológicos que emplean enzimas. La eficiencia de este método depende de varios parámetros, tales como el tipo y concentración de ácido, la temperatura, la proporción de biomasa-ácido y el tiempo de reacción. Entre las técnicas de hidrolizado existentes, la explosión de vapor se destaca por su bajo impacto ambiental, uso reducido de productos químicos, alta eficiencia energética y una completa recuperación de azúcares, lo que lo hace más ventajoso en comparación con otros métodos. Además, estudios han demostrado que los métodos convencionales requieren hasta un 70% más de energía que la explosión de vapor para lograr una producción significativa de azúcares reductores. Sin embargo, la eficacia de este puede verse

influenciada por factores como la temperatura del vapor, el tiempo de exposición, el tamaño de la biomasa y su contenido de humedad (Baruah et al., 2018).

#### **Uso del método DNS para medición de azúcares reductores**

El método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) usado en la presente investigación, es un método que se utiliza para la determinación de azúcares reductores debido a su eficacia, simplicidad y bajo costo. El principio del método se basa en la oxidación de los grupos funcionales de los azúcares reductores (aldehídos y cetonas) bajo condiciones alcalinas y de calor, lo que resulta en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, produciendo un compuesto de color anaranjado cuya intensidad es proporcional a la concentración de azúcares reductores presentes. Asimismo, este método se destaca como una alternativa viable frente a técnicas analíticas más avanzadas, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que tienen muchas ventajas; sin embargo, requiere de equipos sofisticados, personal especializado y tiempos de análisis más prolongados. Su facilidad de uso, disponibilidad de reactivos y aplicación en análisis rápidos lo convierten en una herramienta clave en diversas investigaciones (Texeira y Santos, 2022; Wood et al., 2012)

#### **4.4. Obtención de bioetanol a partir de la fermentación del hidrolizado**

En el proceso de fermentación se utilizó inóculo de *Sacharomyces cerevisiae*, una de las levaduras más estudiadas y utilizadas debido a que reduce los compuestos inhibidores en hidrolizados lignocelulósicos aumentando el rendimiento y la tasa de producción de etanol (Tesfaw& Assefa, 2014; Matsushika et al., 2009). Durante el proceso de la fermentación, es importante mantener un control sobre los parámetros como la temperatura, pH y oxígeno debido a que estos influyen de forma significativa durante la reducción de azúcares reductores (Fatima et al., 2024), de la siguiente forma:

### **Influencia de la temperatura**

Se ha reportado que la tasa de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y la producción máxima de etanol se encuentra entre los 20 y 35 °C. Por esta razón, el proceso de fermentación en la presente investigación se llevó a cabo a una temperatura controlada de 30 °C con el propósito de maximizar la conversión de azúcares en etanol, alineándose con los hallazgos de estudios que destacan la importancia de las condiciones térmicas en la eficiencia del proceso fermentativo (Choudhary et al., 2016).

### **Influencia del pH**

El pH es otro factor crucial que influye en la fermentación de etanol. En estudios anteriores, se ha demostrado que cuando el pH supera el nivel de 5, la producción de etanol disminuye significativamente. En este sentido, se ha establecido que un rango óptimo de pH de 4 a 5 es el límite operativo para la fermentación anaeróbica con *S. cerevisiae* (Narayanan et al., 2016). Por lo tanto, en este estudio, se agregó hidróxido de sodio (NaOH) concentrado al hidrolizado para ajustar el pH a 5, lo que favoreció el crecimiento de la levadura.

### **Influencia de la concentración inicial de células de inóculo**

Existen estudios donde se ha reportado que un exceso de azúcares puede inhibir la actividad fermentativa de las levaduras limitando así la producción de bioetanol. Estos hallazgos sugieren que un balance adecuado entre la concentración de levadura y la disponibilidad de azúcares es fundamental para optimizar la producción de bioetanol (Ko et al., 2020).

La Figura 13 presenta el comportamiento de la concentración de azúcares reductores durante el proceso de fermentación del hidrolizado de jacinto de agua, monitorizado hasta las 72 horas, con intervalos de muestreo cada 24 horas. El proceso de fermentación se realizó por triplicado, iniciando con una concentración promedio de 4.530 g/L, tal como se detalla en la Tabla 9. Al

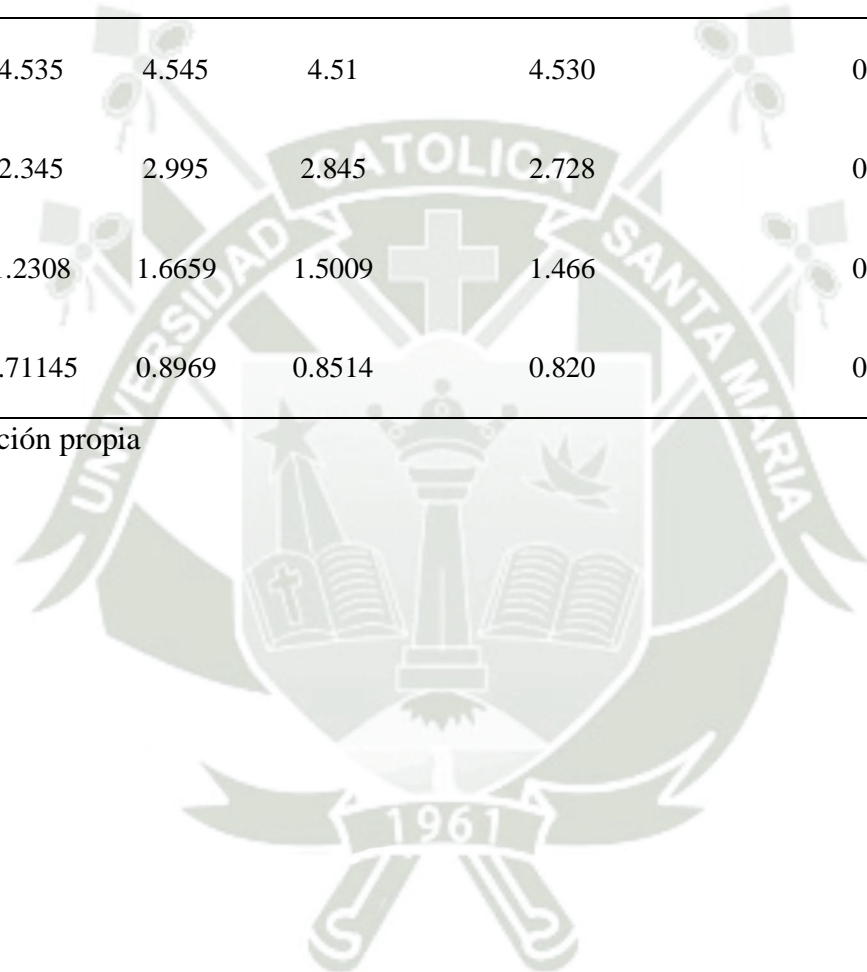
finalizar el proceso, se obtuvo una reducción significativa en la concentración de azúcares, alcanzando un valor promedio final de 0.820 g/L.

**Tabla 9.**

*Comportamiento de los azúcares reductores durante el proceso de fermentación*

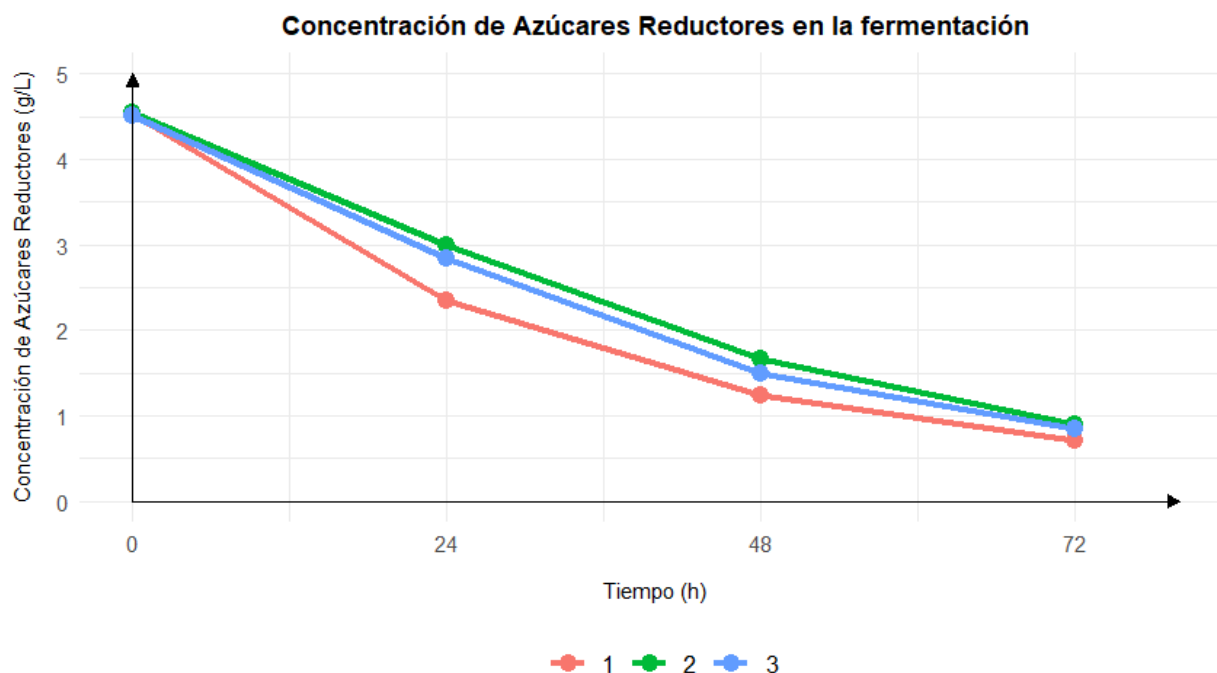
<b>Tiempo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Promedio (g/L)</b>	<b>Desviación estándar (g/L)</b>
<b>0 horas</b>	4.535	4.545	4.51	4.530	0.015
<b>24 horas</b>	2.345	2.995	2.845	2.728	0.278
<b>48 horas</b>	1.2308	1.6659	1.5009	1.466	0.179
<b>72 horas</b>	0.71145	0.8969	0.8514	0.820	0.079

*Nota.* Elaboración propia



**Figura 13.**

Concentración de azúcares reductores respecto al tiempo de fermentación



*Nota.* Elaboración propia

El descenso en la concentración de azúcares reductores está directamente relacionado con la conversión de azúcares en bioetanol por la acción de la levadura *S. cerevisiae* durante la fermentación anaeróbica. Según estudios diversos, el uso de azúcares reductores en la fermentación resulta fundamental para la obtención de bioetanol, dado que dichos azúcares se constituyen la principal fuente de energía para que las levaduras se metabolicen y con ello produzcan bioetanol (Waseem et al., 2024).

El comportamiento observado en esta investigación es consistente con estudios que han demostrado que, a medida que avanza la fermentación, los azúcares presentes en el medio disminuyen a medida que son consumidos por las levaduras. Esto indica un proceso de fermentación exitoso, ya que la reducción significativa en la concentración de azúcares reductores

confirma que las levaduras estaban activas y funcionales en la conversión de dichos azúcares en bioetanol (Ningthoujam et al., 2023). El hecho de que la concentración final haya alcanzado un valor tan bajo 0.82 g/L demuestra que la mayor parte de los azúcares fueron convertidos, lo cual es un indicador positivo para la eficiencia del proceso.

En este caso, la biomasa de *Eichhornia crassipes* (jacinto de agua) resultó ser una materia prima eficiente para la producción de bioetanol contribuyendo a una fuente de energía renovable con un proceso eficiente y económico. La capacidad de esta planta para generar azúcares reductores, sumado al alto rendimiento en la fermentación, confirma su potencial como materia prima viable en estudios actuales sobre bioetanol (Shukla et al., 2023). Sin embargo, por lo referido por Saravanan et al. (2023) es importante señalar que el control de factores como la concentración de inóculo, la temperatura y el pH del medio de fermentación son esenciales para maximizar el rendimiento en el proceso, por lo que, durante la experimentación estos fueron parámetros que fueron considerados en este estudio.

El proceso de fermentación de azúcares reductores obtenidos de fuentes lignocelulósicas, como el jacinto de agua, ha sido ampliamente estudiado en los últimos años. Estudios recientes han demostrado que el pretratamiento adecuado y la optimización de las condiciones de fermentación pueden llevar a la obtención de rendimientos cercanos al 90% de conversión de azúcares en bioetanol, dependiendo de las condiciones de la fermentación (Das et al., 2016).

**Tabla 10.**

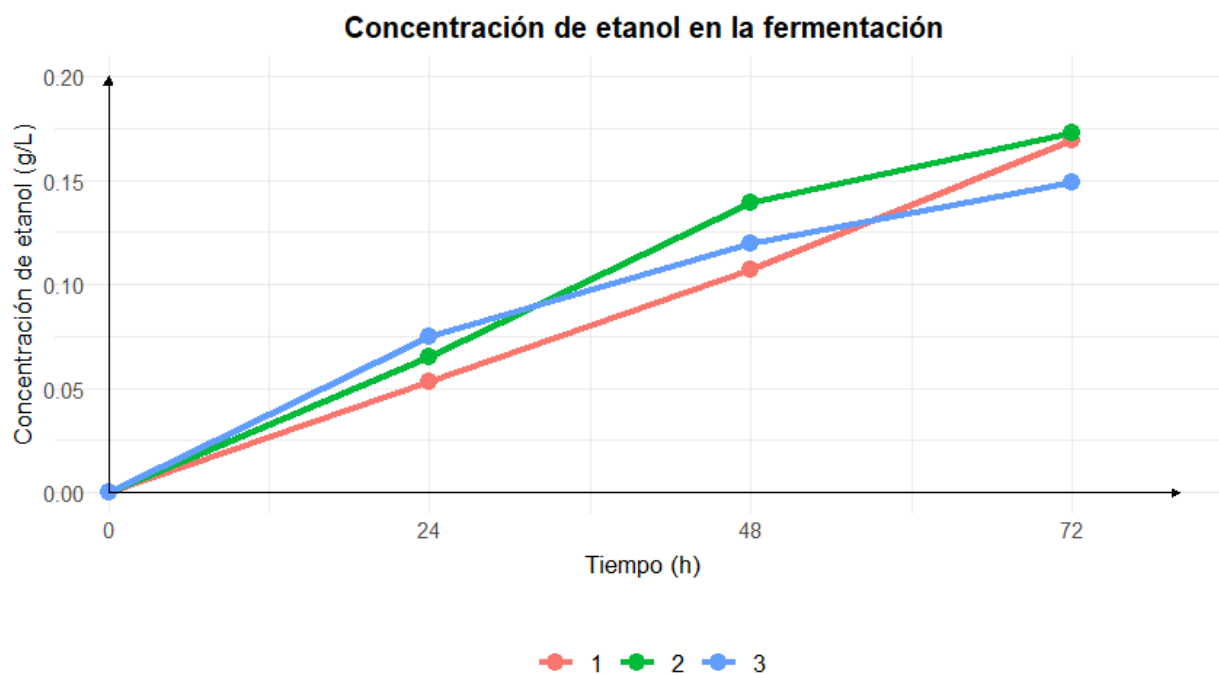
*Resultados de la concentración de etanol en el proceso de la fermentación*

Tiempo	1	2	3	Promedio	Desviación estándar
<b>24 horas</b>	0.053	0.065	0.075	0.064	0.009
<b>48 horas</b>	0.107	0.139	0.12	0.122	0.013
<b>72 horas</b>	0.169	0.173	0.149	0.164	0.010

*Nota.* Elaboración propia

**Figura 14.**

*Evolución de la concentración de bioetanol durante el proceso de fermentación del Hidrolizado*



*Nota.* Elaboración propia

**Tabla 11.**

*Evaluación de concentración de bioetanol obtenido a partir de plantas acuáticas*

Planta acuática utilizada	Concentración de bioetanol obtenido (g/L)
<i>Pistia stratiotes</i>	4 g/L <sup>1</sup>
<i>Pistia stratiotes L.</i>	14.9 g/L <sup>2</sup>
<i>Eichhornia crassipes</i>	14.4 g/L <sup>2</sup>
<i>Salvinia auriculata</i>	1.052 g/L <sup>3</sup>
<i>Eichhornia crassipes</i>	0.164 g/L <sup>4</sup>

*Nota.* Valores de concentración de azúcares reductores tomado de investigaciones realizadas por (1) Jelani et al. (2015), (2) Soda et al. (2013), (3) Trejo et al. (2022) y (4) esta investigación.

La producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica proveniente de plantas acuáticas es un tema que viene siendo abordado en el ámbito de las energías renovables. Los resultados de la tabla 10 indican que, en esta investigación, la concentración obtenida de bioetanol a partir de biomasa de *Eichhornia crassipes* fue de 0.164 g/L alcanzándose la concentración máxima a las 72 horas de fermentación como se puede observar en la Figura 14. Al comparar este valor con otros estudios que han utilizado plantas acuáticas (Tabla 11) como materia prima para la producción de bioetanol, se observa que se han reportado concentraciones superiores a la obtenida en este estudio. Por ejemplo, *Pistia stratiotes L.* y *Eichhornia crassipes* bajo otras condiciones experimentales realizadas por Soda et al. (2013) alcanzaron concentraciones de 14.9 g/L y 14.4 g/L, respectivamente, otra investigación con la especie *Pistia stratiotes* generó una concentración equivalente de 4 g/L mientras que, *Salvinia auriculata* evidenció un resultado mucho menor con 1.052 g/L de bioetanol. A pesar de que esta última especie presenta niveles de azúcares reductores más bajos en comparación con el jacinto de agua analizado en nuestra investigación, obtuvo una

concentración de alcohol, esto podría explicarse por la optimización de los parámetros en el proceso de fermentación o a la producción de inhibidores.

No obstante, pese a que los resultados obtenidos en esta investigación son notablemente menores en comparación con los estudios anteriormente mencionados, es fundamental considerar que la capacidad de una planta acuática no depende únicamente de la cantidad de azúcares reductores generada para la producción de bioetanol, sino que también depende de varios factores relacionados con los procesos de conversión como el pretratamiento de la biomasa, hidrólisis y fermentación.

Por otro lado, es importante tener en cuenta que, los bajos rendimientos obtenidos pueden estar vinculados a la generación de inhibidores durante los procesos de conversión, por ejemplo, luego del hidrolizado, el líquido resultante puede contener diversos compuestos los cuales interfieren con el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada durante la fermentación. En ese sentido, con el objeto de optimizar la obtención de bioetanol, es importante controlar la generación de estos inhibidores, por tal motivo autores como Sjulander & Kikas (2020) han mencionado la implementación de varias estrategias, como el uso de levaduras resistentes a inhibidores, la detoxificación del hidrolizado o la optimización de las condiciones de fermentación. En consecuencia, futuros estudios podrían centrarse en el tratamiento de estos inhibidores para mejorar aún más los rendimientos de bioetanol desde el punto de vista económico y ambiental.

En base a lo anteriormente referido, a pesar de la baja concentración de bioetanol obtenida, es necesario resaltar que *Eichhornia crassipes*, es una planta acuática altamente invasiva y de rápido crecimiento, lo que la constituye en una fuente viable para la obtención de un biocombustible de segunda generación como lo es el bioetanol, garantizando así, una solución sostenible y viable a las diferentes problemáticas ambientales (Pin et al., 2021).

#### 4.5. Determinación del Rendimiento del bioetanol

De acuerdo con los resultados del balance de materia, el rendimiento volumétrico de bioetanol respecto a la concentración de azúcares reductores fue del 71.35%, lo cual es consistente con estudios similares sobre producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica. Nigam (2002), por ejemplo, reportó rendimientos que oscilan entre 65% y 75% utilizando el mismo inóculo de la presente investigación para la fermentación de materiales lignocelulósicos, confirmando la efectividad de *Saccharomyces cerevisiae* en este tipo de procesos. Un estudio similar de Phwan et al. (2014) cuya materia prima en estudio fue también el jacinto de agua reportó un rendimiento de conversión de azúcares del 70.5%, lo que indica que el presente trabajo logró resultados comparables.

**Tabla 12.**

*Comparación del rendimiento de etanol con diversas plantas acuáticas*

Planta acuática utilizada	Rendimiento de bioetanol obtenido (ml/g)	Referencia
<i>Pistia stratiotes</i>	0.28	Rezania et al. (2017)
<i>Ipomoea aquatica</i>	0.20	Kumari et al. (2021)
<i>Typha latifolia</i>	0.18	Rezania et al. (2020)
<i>Lemna minor</i>	0.15	Verma et al. (2020)
<i>Eichhornia crassipes</i>	0.12	Esta investigación

La obtención de bioetanol a partir de biomasa de *Eichhornia crassipes* (jacinto de agua) en esta investigación ha evidenciado un rendimiento equivalente a 0.12 ml/g con relación a la biomasa inicial utilizada, pese a que este resultado es ligeramente menor en comparación con otras plantas acuáticas, se revela el potencial de esta especie como recurso renovable para la producción de biocombustibles.

Al comparar este rendimiento con la biomasa lignocelulósica de otros ejemplares (Tabla 12), se puede observar que hay variaciones significativas según la especie y las condiciones de los procesos a los que son sometidas. Por ejemplo, estudios realizados con *Pistia stratiotes* (lechuguilla de agua) han reportado un rendimiento de hasta 0.28 ml/g bajo condiciones óptimas de fermentación (Rezania et al., 2017). Por otro lado, *Ipomoea aquatica* (espinaca de agua), una planta común en humedales ha mostrado rendimientos cercanos a 0.20 ml/g (Kumari et al., 2021). Estos resultados son superiores al obtenido en esta investigación dado a que podrían estar influenciados por la composición de carbohidratos presentes en cada planta, así como las condiciones de pretratamiento, hidrólisis y fermentación empleadas en los estudios respectivos. En base al párrafo anterior, pese a que el rendimiento obtenido es menor en comparación con otras especies, es importante destacar que el jacinto de agua tiene ventajas adicionales que deben ser consideradas. En primer lugar, su rápida tasa de crecimiento lo convierten en una biomasa accesible y de bajo costo, características que podrían compensar su rendimiento relativamente bajo en términos de biomasa inicial. Además, su capacidad para proliferar en cuerpos de agua eutrofizados y el hecho de constituirse como una especie invasora le confieren un valor agregado, ya que su utilización para la producción de bioetanol no solo reduciría los impactos ambientales negativos que causa, sino que también ofrecería una solución con un beneficio doble relacionado al control de una maleza acuática y la generación de energía limpia (Zhang et al., 2018). Asimismo, el artículo de revisión realizado por Tse et al. (2021) reporta diferentes rendimientos de bioetanol según el tipo de generación. Para la producción de bioetanol de primera generación, los valores registrados incluyen 430 L·t<sup>-1</sup> para el arroz, 110 L·t<sup>-1</sup> para la remolacha azucarera y 340 L·t<sup>-1</sup> para el trigo. En el caso del bioetanol de segunda generación, se destacan 362-456 L·t<sup>-1</sup> para el rastrojo de maíz, 318-500 L·t<sup>-1</sup> para el bagazo de caña de azúcar y 347 L·t<sup>-1</sup> para el Agave

americana. Comparado con lo reportado en nuestra investigación es de 0.12 ml/g lo cual es equivalente a  $108 \text{ L} \cdot \text{t}^{-1}$  que resulta ser un valor significativo comparado a los otros estudios.

Por otro lado, es importante señalar que, las pérdidas en el rendimiento podrían estar relacionadas con la formación de subproductos durante el pretratamiento de la biomasa o la hidrólisis ácida, así como con la selección de la levadura utilizada en la fermentación. Algunos estudios, como el de Balat et al. (2008), han propuesto el uso de cepas genéticamente modificadas o adaptadas a medios lignocelulósicos para mejorar el rendimiento, lo que podría ser una vía de investigación en el futuro.

Con relación al rendimiento volumétrico, el presente estudio obtuvo un valor del 71.35%, por lo que es posible que subproductos como furfural y 5-hidroximetilfurfural (HMF) hayan inhibido parcialmente la actividad fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae*. Se ha reportado que, la formación de estos compuestos es común durante la hidrólisis ácida, especialmente cuando se utilizan ácidos fuertes como el  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Investigaciones como las de Palmqvist y Hahn-Hägerdal (2000) destacan que furfural y HMF, se generan durante la degradación de pentosas y hexosas, lo que reduce el rendimiento fermentativo al interferir con el metabolismo celular de las levaduras.

Este fenómeno también ha sido observado por Olsson y Hahn-Hägerdal (1996), quienes indicaron que la presencia de inhibidores derivados de la lignina, como los ácidos fenólicos y aldehídos, afecta significativamente la fermentación teniendo como consecuencia la reducción del rendimiento global. En comparación, estudios como los de Cantarella et al. (2004), en el que se analizó la producción de bioetanol a partir de residuos de maíz, reportaron rendimientos superiores equivalentes a 75-78% debido al uso de pretratamientos enzimáticos en lugar de ácidos, los cuales producen menos subproductos inhibidores. En contraste, investigaciones como las de Sanchez & Cardona (2008) reportaron rendimientos similares ubicados entre el 70-72% debido a la limitación

generada por la formación de furfural. Por lo tanto, estos autores sugieren que la neutralización parcial de los ácidos y la incorporación de un detoxificador podrían mejorar la eficiencia de la fermentación.

En este contexto, el rendimiento de bioetanol obtenido no depende únicamente del contenido lignocelulósico presente en la planta, sino también de la eficacia de los procesos de pretratamiento, hidrólisis y fermentación a los que se somete la biomasa debido a que estos procesos juegan un papel clave en la generación de inhibidores que afectan negativamente la eficiencia de conversión. Por ello, resulta fundamental que investigaciones futuras se orienten hacia la optimización integral de los procesos combinando técnicas químicas y enzimáticas para maximizar el rendimiento de bioetanol a partir de *Eichhornia crassipes* (Das et al., 2019). Además, la mitigación de los subproductos inhibidores debe ser considerado por futuros investigadores a través del uso de agentes detoxificadores o la selección de cepas de levaduras más resistentes a los inhibidores lo que podría representar un avance significativo en la obtención de mayores rendimientos en la producción de bioetanol (Sanchez & Cardona, 2008). Se sugiere que investigaciones futuras incluyan un análisis detallado de las propiedades fisicoquímicas de los combustibles. Entre las características más relevantes a considerar se encuentran la densidad, la viscosidad cinemática, el punto de fluidez, el punto de enturbiamiento, el punto de inflamación y el valor calorífico, ya que son factores clave para evaluar su calidad y rendimiento (Tarangan et al., 2023).

### **Aplicación de la experimentación de producción de bioetanol a nivel industrial**

Con el objeto de llevar el objetivo de la presente investigación a una aplicación industrial, es preciso tener en cuenta la optimización del pretratamiento, en base a los resultados obtenidos, se debe asegurar que el pretratamiento con NaOH y la hidrólisis ácida sean eficientes a gran escala. Autores como Nahar & Sunny (2024) sugieren a la implementación de reactores continuos o por

lotes para optimizar el proceso. Así también, en el estudio de Das et al. (2014), se planteó el uso de enzimas hidrolíticas y microbios fermentativos. Además de ello, es importante determinar la cantidad de biomasa de jacinto de agua que se puede recolectar y procesar por día en función de la disponibilidad local y la capacidad de los equipos industriales.

De igual manera, se debe garantizar que haya un suministro sostenible de biomasa de jacinto de agua en las zonas afectadas por su crecimiento excesivo. En ese sentido, se podrían establecer convenios con gobiernos locales o incluso las comunidades para establecer programas de recolección continua. Por otra parte, también es necesario evaluar los costos de infraestructura, energía y mano de obra, así como de la implementación de tecnologías que permitan la automatización de procesos, como la fermentación y destilación. Se ha mencionado que los sistemas de monitoreo automatizados reducen la intervención manual y mejoran la eficiencia del proceso (Abeysuriya et al., 2024).

En cuanto a la generación de subproductos derivados del proceso, como los residuos sólidos de la biomasa, estos se podrían aprovechar para generar biogás o fertilizantes, contribuyendo a mejorar la rentabilidad del proyecto y minimizando los residuos (Khan et al., 2021).

### **Costos de la producción de bioetanol**

En referencia a los costos del bioetanol, estos se encuentran vinculados a su concentración y rendimiento. La producción de bioetanol de segunda generación (2G) a partir de biomasa lignocelulósica podría volverse más rentable mediante la optimización del pretratamiento, el aumento del rendimiento en la sacarificación y la mejora de la eficiencia en la fermentación. Por consiguiente, es fundamental reevaluar el proceso tecnológico empleado en la producción de bioetanol, identificar sus deficiencias y proponer soluciones que lo hagan viable desde una perspectiva industrial y económica (Ceaser et al., 2024). El bioetanol no puede emplearse como

combustible único en motores diésel, por lo que debe mezclarse con petrodiesel. El uso de esta mezcla presenta ciertos beneficios, como un aumento en la tasa de combustión premezclada, una mayor eficiencia térmica y una reducción en la emisión de humo (Tarangan et al., 2023). Para proyectar los costos del bioetanol como biocombustible para un vehículo y compararlo con combustibles convencionales, es necesario considerar varios factores como el consumo de combustible del vehículo, es decir, se necesita conocer la cantidad de combustible que se consume por kilómetro recorrido, costo de bioetanol, el cual puede variar según la región, las condiciones del mercado y el proceso de producción. Por otro lado, debe considerarse el valor energético y el más importante que hace referencia a la conversión del vehículo, es decir, si el vehículo puede funcionar con etanol puro (E100) o si debe usar mezclas como E10 (10% etanol y 90% gasolina) o E85 (85% etanol y 15% gasolina). Se ha reportado que el costo de producción de bioetanol tiene un valor de 0,32 €/kg según los datos del inventario de costos de 2010, que consideraron factores como maquinaria, personal y costos operativos de la planta de bioetanol. Por su parte, el costo de producción de la gasolina se fijó en 0,69 €/kg, basado en datos de referencia del año 2009. Asimismo, se han analizado tecnologías y costos relacionados con la producción de bioetanol a partir de caña de azúcar en comparación con los combustibles de gasolina, considerando su uso en la conducción de automóviles. Basándose en datos de costos de 2005, se determinó que el costo de producción de la gasolina era de \$0,59/kg, mientras que el costo de producción del etanol se estimó en \$0,30/kg en el escenario base y \$0,26/kg en el escenario proyectado (Daylan & Ciliz, 2016; Luo et al., 2009). El costo total de las materias primas y los productos químicos influye significativamente en el costo general de producción de bioetanol, por lo que en la tabla 13 se puede observar los costos de producción para una planta de producción de bioetanol.

**Tabla 13.***Costos de productos químicas una planta de producción de bioetanol*

<b>Materia prima</b>	<b>Coste (€/kg bioetanol)</b>
Acetato de vinilo	0.8
Ácido sulfúrico	0.35
Cal hidratada	0.08
CSL	0.48
Enzima celulasa	0.36
Amoníaco	0.2
Urea	0.38
Costo de la levadura	3.5
SALTO	0.28
Productos químicos para calderas	2.9
Productos químicos para aguas residuales	0.35
Polímero de aguas residuales	5.7

*Nota.* Tabla tomada de la investigación realizado por Daylan & Ciliz, (2016)



## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### A. Conclusiones

- PRIMERO.** Se logró determinar con éxito el alto contenido de humedad en el Jacinto de Agua (*Eichhornia crassipes*), el cual obtuvo un valor promedio de **92.45 ± 0.69 %**, lo que refuerza su característica como una biomasa acuática. Además, el contenido de **35.28 % de lignina** evidenciado en esta investigación, resalta el elevado nivel de este componente estructural en la planta, lo que expone la importancia de establecer condiciones óptimas de pretratamiento de modo que este resulte eficaz para facilitar la liberación de azúcares fermentables y mejorar el rendimiento de bioetanol.
- SEGUNDO.** Se definieron condiciones óptimas para el pretratamiento alcalino de la biomasa pulverizada de Jacinto de Agua (*Eichhornia crassipes*). El diseño experimental reveló que el tratamiento con **NaOH al 1 %**, un tiempo de explosión a vapor de **30 minutos** y un tamaño de partícula de **150 µm** son las condiciones más eficientes, logrando una concentración máxima de 3.010 g/L de azúcares reductores, resultado que se constituye clave para la obtención de bioetanol. Aunque el análisis estadístico mostró que el tamaño de partícula no influyó significativamente en los resultados, el proceso optimizado evidencia la viabilidad de este pretratamiento para maximizar la producción de azúcares fermentables.

**TERCERO.** La hidrólisis ácida de la biomasa pretratada, realizada con ácido sulfúrico diluido, demostró una producción promedio de **4.530 g/L de azúcares reductores** en los hidrolizados. Este resultado evidencia la efectividad del proceso para liberar azúcares fermentables. En ese sentido, los resultados reafirman el potencial del Jacinto de Agua (*Eichhornia crassipes*) como una fuente viable de azúcares necesarios para la fermentación y posterior producción de bioetanol confirmando su valor como fuente de energía renovable.

**CUARTO.** La fermentación de los hidrolizados inoculados con levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y controlados durante 72 horas, produjo una concentración de **0.164 g/L de bioetanol**, valor que, comparado con otras especies acuáticas resulta significativo teniendo en cuenta las condiciones de crecimiento de la especie lo que permite una producción sostenible y escalable.

**QUINTO.** El rendimiento volumétrico de la concentración de azúcares reductores con respecto a la concentración de bioetanol el cual obtuvo un valor equivalente a **71.35%** mientras que, el rendimiento en términos de biomasa inicial fue de **0.12 ml/g**. Estos resultados destacan el potencial de del Jacinto de Agua (*Eichhornia crassipes*) como un recurso valioso y sostenible para la producción de biocombustibles, posicionándolo como una alternativa renovable con un potencial significativo para contribuir a la transición hacia energías más respetuosas con el medio ambiente.

## B. Recomendaciones

1. Se recomienda a futuras indagaciones, realizar el pretratamiento considerando a variables como la temperatura, tener en cuenta, un valor referencial más bajo que el considerado en la presente investigación con el objeto de determinar la temperatura óptima que garantice obtener mayor concentración de azúcares reductores.
2. Se recomienda a futuras investigaciones enfocadas a la producción de biocombustibles, realizar un inventario de las plantas acuáticas, que, en su mayoría, son consideradas como una maleza en la ciudad de Arequipa, a fin de aprovechar su biomasa lignocelulósica para la producción de biocombustibles de segunda generación y de esa manera buscar sustituir las fuentes de combustible por las amigables con el medio ambiente.
3. Se recomienda a futuras investigaciones, considerar una hidrólisis enzimática, debido a que, en estudios como el de Vasić et al. (2021) han reportado que este tipo de hidrólisis presenta un proceso importante en la conversión de la celulosa en la biomasa pretratada. Además, la hidrólisis enzimática tiene muchas posibilidades para mejorar la producción de enzimas, su reciclaje y la selección genética.
4. Se recomienda trabajar con tamaños de partícula mayores a los de la presente investigación, ya que se demostró que trabajando tamaño de partícula muy pequeños no influye significativamente en la producción de azúcares reductores.
5. Se recomienda realizar diseños experimentales en los procesos de hidrolisis y fermentación para optimizar los resultados y aumentar la producción de etanol.

## REFERENCIAS

- Abba, A., & Sankarannair, S. (2024). Global impact of water hyacinth (*Eichhornia Crassipes*) on rural communities and mitigation strategies: a systematic review. *Environmental Science and Pollution Research* 2024 31:31, 31(31), 43616–43632. <https://doi.org/10.1007/S11356-024-33905-7>
- Abdul Wahhab, H. A., & Al-Kayiem, H. H. (2021). Environmental risk mitigation by biodiesel blending from *Eichhornia crassipes*: performance and emission assessment. *Sustainability*, 13(15), 8274. <https://doi.org/10.3390/su13158274>
- Abeyhuriya, D. I., Sethunga, G. S. M. D. P., & Rathnayake, M. (2024). Process simulation–based scenario analysis of scaled-up bioethanol production from water hyacinth. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(15), 17677-17692. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-03891-w>
- Abo, B., Gao, M., Wang, Y., Wu, C., Ma, H., & Wang, Q. (2019). Lignocellulosic biomass for bioethanol: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes. *Reviews on Environmental Health*, 34 (1), 57-68. <https://doi.org/10.1515/reveh-2018-0054>
- Ahmed, M. (2020). Statistics and Modeling. In M. Ahmed (Ed.), *Systems Modeling* (pp. 61–110). Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-4728-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4728-7_3)
- Alalwan, H. A., Alminshid, A. H., & Aljaafari, H. A. S. (2019). Promising evolution of biofuel generations. Subject review. *Renewable Energy Focus*, 28, 127–139. <https://doi.org/10.1016/J.REF.2018.12.006>

- Allam, F., Elnouby, M., El-Khatib, K. M., El-Badan, D. E., & Sabry, S. A. (2020). Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) biochar as an alternative cathode electrocatalyst in an air-cathode single chamber microbial fuel cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(10), 5911–5927. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2019.09.164>
- Amiri, H., & Karimi, K. (2018). Pretreatment and hydrolysis of lignocellulosic wastes for butanol production: Challenges and perspectives. *Bioresource Technology*, 270, 702–721. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.08.117>
- Ankit, Saha, L., Kumari, K., Sinha, S., Bordoloi, N., Tiwari, J., Korstad, J., & Bauddh, K. (2020). *Removal of Organic Pollutants from Contaminated Water Bodies by Using Aquatic Macrophytes Coupled with Bioenergy Production and Carbon Sequestration*. 221–244. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1390-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1390-9_10)
- Arefin, M. A., Rashid, F., & Islam, A. (2021). A review of biofuel production from floating aquatic plants: an emerging source of bio-renewable energy. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 15(2), 574-591. <https://doi.org/10.1002/bbb.2180>
- Ayodele, B., Alsaffar, M. & Mustapa, S. (2020). An overview of integration opportunities for sustainable bioethanol production from first- and second-generation sugar-based feedstocks. *Journal of Cleaner Production*, 245, 118857. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118857>
- Azwar, E., Chan, D. J. C., Kasan, N. A., Rastegari, H., Yang, Y., Sonne, C., ... & Lam, S. S. (2022). A comparative study on physicochemical properties, pyrolytic behaviour and kinetic parameters of environmentally harmful aquatic weeds for sustainable shellfish

- aquaculture. *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127329.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127329>
- Balat, M., Balat, H., & Öz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(5), 551-573. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2007.11.001>
- Baruah, J., Nath, BK, Sharma, R., Kumar, S., Deka, RC, Baruah, DC y Kalita, E. (2018). Tendencias recientes en el pretratamiento de biomasa lignocelulósica para productos de valor agregado. *Frontiers in Energy Research*, 6, 141.  
<https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00141>
- Bauddh, K., Singh, B., & Korstad, J. (2017). Phytoremediation potential of bioenergy plants. *In Phytoremediation Potential of Bioenergy Plants*. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-3084-0>
- Bhatia, S. K., Jagtap, S. S., Bedekar, A. A., Bhatia, R. K., Patel, A. K., Pant, D., Rajesh Banu, J., Rao, C. V., Kim, Y. G., & Yang, Y. H. (2020). Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. *Bioresource Technology*, 300, 122724.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.122724>
- Bote, M. A., Naik, V. R., & Jagadeeshgouda, K. B. (2020). Review on water hyacinth weed as a potential bio fuel crop to meet collective energy needs. *Materials Science for Energy Technologies*, 3, 397–406. <https://doi.org/10.1016/J.MSET.2020.02.003>
- Bottino, F., Souza, B., Rocha, R., Cunha-Santino, M. & Bianchini Jr. (2021). Characterization of humic substances from five macrophyte species decomposed under

different nutrient conditions. *Limnetica*, 40(2): 267-278 (2021).

<https://doi.org/10.23818/limn.40.18>

Bronzato, G., Ziegler, S., Silva, R., Cesarino, I., & Leão, A. (2017). Characterization of the pre-treated biomass of *Eichhornia crassipes* (water hyacinth) for the second generation ethanol production. *Molecular Crystals And Liquid Crystals*, 655(1), 224-235.

<https://doi.org/10.1080/15421406.2017.1360696>

Burgos Montañez, L. J. (2020). Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. *Revista de Investigación*, 13(1),

57–66. <https://doi.org/10.29097/23461098.308>

Cantarella, L., Sannino, F., & Montagnaro, S. (2004). Ethanol production from waste materials: A case study on corn stover. *Environmental Engineering and Management Journal*, 3(2), 367-374.

Carlini, M., Castelluci, S. & Mennuni, A. (2018). Water hyacinth biomass: chemical and thermal pre-treatment for energetic utilization in anaerobic digestion process. *Energy Procedia*, 148, 431–438. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.08.106>

Carreño Sayago, U. F. (2019). Design of a sustainable development process between phytoremediation and production of bioethanol with *Eichhornia crassipes*. *Environmental Monitoring and Assessment* 2019 191:4, 191(4), 1–8.

<https://doi.org/10.1007/S10661-019-7328-0>

- Carreño Sayago, U. F. (2021). Desarrollo de un sistema sostenible de fitorremediación y bioetanol con *E. crassipes*. *Tecnología y Ciencias Del Agua*, 12(4), 269–292. <https://doi.org/10.24850/J-TYCA-2021-04-0>
- Ccarhuarupay, R., Checcya, J. & Salhua, M. (2023). Microorganismos eficaces y fitorremediación en humedales mixtos artificiales para el tratamiento de aguas residuales de curtiembre del Parque Industrial Río Seco - Arequipa, 2021 (Tesis de pregrado). Universidad Continental. <https://repositorio.continental.edu.pe/handle/20.500.12394/13023>
- Ceaser, R., Montané, D., Constantí, M., & Medina, F. (2024). Current progress on lignocellulosic bioethanol including a technological and economical perspective. *Environment, Development and Sustainability* 2024, 1–46. <https://doi.org/10.1007/S10668-024-04792-2>
- Chen, J., Zhang, B., Luo, L., Zhang, F., Yi, Y., Shan, Y., Liu, B., Zhou, Y., Wang, X., & Lü, X. (2021). A review on recycling techniques for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 149, 111370. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2021.111370>
- Choudhary, J., Singh, S., & Nain, L. (2016). Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology*, 21, 82-92. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.02.007>

- Codoche, L., & D. López Gerardo. (1989). *Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes*. 153–157. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(89\)90069-4](https://doi.org/10.1016/0269-7483(89)90069-4)
- Da Silva, A. S. A., Espinheira, R. P., Teixeira, R. S. S., De Souza, M. F., Ferreira-Leitão, V., & Bon, E. P. S. (2020). Constraints and advances in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: a critical review. *Biotechnology for Biofuels* 2020 13:1, 13(1), 1–28. <https://doi.org/10.1186/S13068-020-01697-W>
- Dai, N., Huynh, K., Nguyen, T., Do, V. & Van Tran, M. (2021). Hydrothermal and Steam Explosion Pretreatment of *Bambusa stenostachya* Bamboo. *Waste Biomass Valor* ,12, 4103–4112. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01299-5>
- Das, A., Ghosh, P., Paul, T., Ghosh, U., Pati, B. R., & Mondal, K. C. (2016b). Production of bioethanol as useful biofuel through the bioconversion of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *3 Biotech* 2016 6:1, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/S13205-016-0385-Y>
- Das, N., Kumar, P., Phadi, D., Kumar, M. & Sahoo, G. (2021). A comprehensive review of characterization, pretreatment and its applications on different lignocellulosic biomass for bioethanol production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01294-3>
- Das, S. P., Gupta, A., Das, D., & Goyal, A. (2016a). Enhanced bioethanol production from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) by statistical optimization of fermentation process parameters using Taguchi orthogonal array design. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 109, 174–184. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2016.01.008>

- Daylan, B., & Ciliz, N. (2016). Life cycle assessment and environmental life cycle costing analysis of lignocellulosic bioethanol as an alternative transportation fuel. *Renewable Energy*, 89, 578–587. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2015.11.059>
- Deka, D., Das, S. P., Ravindran, R., Jawed, M., Goyal, A., Deka, D., Jawed, Á. M., Goyal, Á. A., Das, S. P., & Ravindran, Á. R. (2018). Water Hyacinth as a Potential Source of Biofuel for Sustainable Development. In C. Springer (Ed.), *Urban Ecology, Water Quality and Climate Change* (pp. 351–363). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74494-0\\_27](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74494-0_27)
- Devi, A., Singh, A., Bajar, S., Pant, D. & Ud, Z. (2021). Ethanol from lignocellulosic biomass: An in-depth analysis of pre-treatment methods, fermentation approaches and detoxification processes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 105798. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105798>
- Espinoza, J., Montaña, B., Valencia, D., Ledesma, A., Vega, A. (2022). Extracción, caracterización y actividad antioxidante de lignina de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) y cáscara de nuez pecanera (*Carya illinoensis*). *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. XXIV (2): 94-103. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v24i2.1642>
- Faisal, M., & Saeed, A. (2021). Sustainable Approaches Toward the Production of Bioethanol from Biomass. *Sustainable Ethanol and Climate Change*, 15–38. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-59280-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-59280-6_2)

Faizal, A., Sembada, A. A., & Priharto, N. (2021). Production of bioethanol from four species of duckweeds (*Landoltia punctata*, *Lemna aquinoctialis*, *Spirodela polyrrhiza*, and *Wolffia arrhiza*) through optimization of saccharification process and fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 294–301. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.10.002>

Favaro, L., Jansen, T., & Van Zyl, W. H. (2019). Exploring industrial and natural *Saccharomyces cerevisiae* strains for the bio-based economy from biomass: the case of bioethanol. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(6), 800–816. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1619157>

García Howell G. (2021). ¿Estamos avanzando en la transición energética en América Latina? Análisis y Consideraciones. <https://www.kas.de/documents/273477/5442457/Estamos+avanzando+en+la+transici%C3%B3n+energ%C3%A9tica+de+Am%C3%A9rica+Latina.pdf/393ae197-2735-5902-1648-fc7881a4ca37?version=1.0&t=1611057850584>

Gaurav, G. K., Mehmood, T., Cheng, L., Klemeš, J. J., & Shrivastava, D. K. (2020). Water hyacinth as a biomass: A review. *Journal of Cleaner Production*, 277, 122214. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2020.122214>

Gavahian, M., Munekata, P. E. S., Eş, I., Lorenzo, J. M., Mousavi Khaneghah, A., & Barba, F. J. (2019). Emerging techniques in bioethanol production: from distillation to waste valorization. *Green Chemistry*, 21(6), 1171–1185. <https://doi.org/10.1039/C8GC02698J>

- Geng, A. (2020). Upgrading of oil palm biomass to value-added products. *Biomass and bioenergy: Applications*, 187-209. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-07578-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-07578-5_10)
- Gebrehiwot, H., Dekebo, A., & Annisa, M. E. (2022). Chemical composition, pharmacological activities and biofuel production of *Eichhornia crassipes* (water hyacinth): a review. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 9(3), 849-866. <https://doi.org/10.18596/jotcsa.1033493>
- Gonzales, S. (2023). Evaluación de la capacidad de fitorremediación de *Eichhornia crassipes* (JACINTO DE AGUA) en efluentes con cromo de una industria curtidora del parque industrial Río Seco, Arequipa (Tesis de pregrado). Universidad Católica de Santa María. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/items/17a9d701-7031-4be5-a339-d7042785d1b7>
- Guo, Y., Yang, Q., Zhou, Y., Xiao, N. & Cai, J. (2022). Effect of three kinds of biological pretreatments on substrate characteristics and sugar yield by enzymatic hydrolysis of *Eichhornia crassipes* biomass. *Bioresource Technology Reports*, 17, 100983. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.100983>
- Gusain, R. & Suthar, S. (2017). Potential of aquatic weeds (*Lemna gibba*, *Lemna minor*, *Pistia stratiotes* and *Eichhornia* sp.) in biofuel production. *Process Safety and Environmental Protection*, 109, 233-241. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.03.030>
- Haldar, D., & Purkait, M. K. (2021). A review on the environment-friendly emerging techniques for pretreatment of lignocellulosic biomass: Mechanistic insight and advancements. *Chemosphere*, 264, 128523. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.128523>

- Hasan, S., Girindran, R., Zacharia, P. U., Jaya, H., Kooren, R., Sayooj, P., Benny, S., Joseph, D., & Hussain, S. V. (2022). Climate resilient products development through valorization of *Eichhornia crassipes* to biofuel and biochar. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19(8), 7617–7624.  
<https://doi.org/10.1007/S13762-021-03523-8/FIGURES/5>
- Hirani, A. H., Javed, N., Asif, M., Basu, S. K., & Kumar, A. (2018). A Review on First- and Second-Generation Biofuel Productions. *Biofuels: Greenhouse Gas Mitigation and Global Warming: Next Generation Biofuels and Role of Biotechnology*, 141–154.  
[https://doi.org/10.1007/978-81-322-3763-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-81-322-3763-1_8)
- Huang, L. Z., Ma, M. G., Ji, X. X., Choi, S. E., & Si, C. (2021). Recent Developments and Applications of Hemicellulose From Wheat Straw: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 440.  
<https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.690773/BIBTEX>
- Ilo, O. P., Simatele, M. D., Nkomo, S. L., Mkhize, N. M., & Prabhu, N. G. (2020). The Benefits of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) for Southern Africa: A Review. *Sustainability* 2020, Vol. 12, Page 9222, 12(21), 9222.  
<https://doi.org/10.3390/SU12219222>
- Ingrao, C., Matarazzo, A., Gorjian, S., Adamczyk, J., Failla, S., Primerano, P., & Huisingh, D. (2021). Wheat-straw derived bioethanol production: A review of Life Cycle Assessments. *Science of The Total Environment*, 781, 146751.  
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.146751>

- Jambo, S. A., Abdulla, R., Mohd Azhar, S. H., Marbawi, H., Gansau, J. A., & Ravindra, P. (2016). A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 65, 756–769. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2016.07.064>
- Jelani, F., Walker, G., & Akunna, J. (2023). Effects of thermo-chemical and enzymatic pre-treatment of tropical seaweeds and freshwater macrophytes on biogas and bioethanol production. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1–10. <https://doi.org/10.1007/S13762-023-04843-7/TABLES/3>
- Jiang, X., Gao, B., & Zheng, J. (2023). Effects of particle size on the preparation of biomass samples for structural characterization. *BioEnergy Research*. <https://doi.org/10.1007/s12155-023-10587-6>
- Jongmeesuk, A., Sanguanchaipaiwong, V., & Ochaikul, D. (2014). Pretreatment and enzymatic hydrolysis from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *CURRENT APPLIED SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 14(2), 79-86.
- Kathirgamanathan, M., Weerasinghe, S., Bowange, T.K. *et al.* Evaluation of co-culture of cellulolytic fungi for enhanced cellulase and xylanase activity and saccharification of untreated lignocellulosic material. *Folia Microbiol* (2024). <https://doi.org/10.1007/s12223-024-01183-y>
- Kaur, M., Kumar, M., Singh, D., Sachdeva, S. & Pun, S. (2019). A sustainable biorefinery approach for efficient conversion of aquatic weeds into bioethanol and biomethane. *Energy Conversion and Management*, 187 (1), 133-147. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.03.018>

- Khan, O., Yadav, A. K., Khan, M. E., & Parvez, M. (2019). Characterization of bioethanol obtained from Eichhornia Crassipes plant; its emission and performance analysis on CI engine. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 1-11. <https://doi.org/10.1080/15567036.2019.1648600>
- Khan, O., Yadav, A. K., Khan, M. E., & Parvez, M. (2021). Characterization of bioethanol obtained from Eichhornia Crassipes plant; its emission and performance analysis on CI engine. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 43(14), 1793-1803. <https://doi.org/10.1007/s11157-024-09693-4>
- Ko, J. K., Enkh-Amgalan, T., Gong, G., Um, Y., & Lee, S. M. (2020). Improved bioconversion of lignocellulosic biomass by *Saccharomyces cerevisiae* engineered for tolerance to acetic acid. *GCB Bioenergy*, 12(1), 90-100. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12656>
- Kochi, L. Y., Freitas, P. L., Maranhão, L. T., Juneau, P., & Gomes, M. P. (2020). Aquatic Macrophytes in Constructed Wetlands: A Fight against Water Pollution. *Sustainability* 2020, Vol. 12, Page 9202, 12(21), 9202. <https://doi.org/10.3390/SU12219202>
- Krishnan, S., Ahmad, M. F., Zainuddin, N. A., Din, M. F. M., Rezania, S., Chelliapan, S., Taib, S. M., Nasrullah, M., & Wahid, Z. A. (2020). Bioethanol production from lignocellulosic biomass (water hyacinth): a biofuel alternative. In *Bioreactors* (pp. 123–143). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821264-6.00009-7>
- Kumar, A., Nm, M., Bezie, Y., Bahir, A., Yadav, M., Amit, K., Nakachew, M., Yilkal, B., & Mukesh, Y. (2018). A review of factors affecting enzymatic hydrolysis of pretreated

lignocellulosic Biomass. *Research Journal of Chemistry and Environment* 22(7), 62–67.

<https://www.researchgate.net/publication/326236093>

Kumar, B., Bhardwaj, N., Agrawal, K., Chaturvedi, V. & Verma, P. (2020). Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. *Fuel Processing Technology*, 199, 106244.

<https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.106244>

Kumar, J., Chaurasia, B., Dubey, A., Faneite, A., Gupta, A., Kothari, R., Prakash, C., Kumar, A., Hashem, A., Alqarawi, A & Abd, E. (2021). Biological Characterization and Instrumental Analytical Comparison of Two Biorefining Pretreatments for Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) Biomass Hydrolysis. *Sustainability*, 13(1), 245;

<https://doi.org/10.3390/su13010245>

Kurniawan, S. B., Ahmad, A., Said, N. S. M., Imron, M. F., Abdullah, S. R. S., Othman, A. R., Purwanti, I. F., & Hasan, H. A. (2021). Macrophytes as wastewater treatment agents: Nutrient uptake and potential of produced biomass utilization toward circular economy initiatives. *Science of The Total Environment*, 790, 148219.

<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.148219>

Laltha, M., Sewsynker-Sukai, Y. & Kana, G. (2021). Development of microwave-assisted alkaline pretreatment methods for enhanced sugar recovery from bamboo and corn cobs: Process optimization, chemical recyclability and kinetics of bioethanol production.

*Industrial Crops and Products*, 174, 114166.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114166>

- Lee, I., & Yu, J. H. (2020). The production of fermentable sugar and bioethanol from acacia wood by optimizing dilute sulfuric acid pretreatment and post treatment. *Fuel*, 275, 117943. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2020.117943>
- Liebl, G. F., de Souza, E. L., Uchôa, P. Z., Marangoni, C., Sellin, N., & Souza, O. (2019). Study of Drying of Banana Pseudo-stem and Influence of Particle Sizes on Biomass Saccharification and Cellulosic Ethanol Production. *Bioenergy Research*, 12(3), 605–625. <https://doi.org/10.1007/s12155-019-09995-4>
- Lin, C. Y., & Lu, C. (2021). Development perspectives of promising lignocellulose feedstocks for production of advanced generation biofuels: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 136, 110445. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2020.110445>
- Lin, Y. C., Shangdiar, S., Chen, S. C., Chou, F. C., Lin, Y. C., & Cho, C. A. (2018). Microwave irradiation with dilute acid hydrolysis applied to enhance the saccharification rate of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Renewable Energy*, 125, 511–517. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2018.02.113>
- Looney, B. (2021). Statistical Review of World Energy. <https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2021-full-report.pdf>
- Luo, L., van der Voet, E., & Huppes, G. (2009). Life cycle assessment and life cycle costing of bioethanol from sugarcane in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(6–7), 1613–1619. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2008.09.024>

- Mafei, T., Neto, F., Peixoto G. et al. (2020). Extraction and Characterization of Hemicellulose from *Eucalyptus* By-product: Assessment of Enzymatic Hydrolysis to Produce Xylooligosaccharides. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **190**, 197–217 .  
<https://doi.org/10.1007/s12010-019-03076-0>
- Malherbe, S. J. M., Cripwell, R. A., Favaro, L., van Zyl, W. H., & Viljoen-Bloom, M. (2023). Triticale and sorghum as feedstock for bioethanol production via consolidated bioprocessing. *Renewable Energy*, **206**, 498–505.  
<https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2023.02.047>
- Manivannan, A., & Narendhirakannan, R. T. (2015). Bioethanol Production From Aquatic Weed Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) by Yeast Fermentation. *Waste and Biomass Valorization*, **6**(2), 209–216. <https://doi.org/10.1007/S12649-015-9347-6/FIGURES/7>
- Mankar, A. R., Pandey, A., Modak, A., & Pant, K. K. (2021). Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. *Bioresource Technology*, **334**, 125235.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.125235>
- Martínez-Soto, D., Ponce-Hernández, A., Maldonado-Miranda, J. J., & Carranza-Álvarez, C. (2021). Application and Viability of Macrophytes as Green Manure. *Microbiota and Biofertilizers*, 69–82. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-48771-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-48771-3_5)
- Matsushika, A., Inoue, H., Murakami, K., Takimura, O., & Sawayama, S. (2009). Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-

- fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 100(8), 2392–2398.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2008.11.047>
- Mejica, G., Unpaprom, Y., Whang, K., & Ramaraj, R. (2021). Cellulosic-derived bioethanol from *Limnocharis flava* utilizing alkaline pretreatment. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01218-7>
- Ministerio de Energía y Minas. (2021). Anuario Estadístico de la Dirección General de Hidrocarburos 2020.  
<https://www.minem.gob.pe/publicacion.php?idSector=5&idPublicacion=636>
- Mostofa, M. (2019). An Introduction to Bioethanol and Its Prospects in Bangladesh: A Review. *Journal of Energy Research and Reviews*, 2 (2), 1-12.  
<https://doi.org/10.9734/JENRR/2019/46018>
- Nahar, K., & Sunny, S. A. (2024). Co-benefits of *Eichhornia Crassipes* (water hyacinth) as sustainable biomass for biofuel production and aquatic ecosystem phytoremediation. *Fuels*, 5(3), 317-333. <https://doi.org/10.3390/fuels5030018>
- Narayanan, V., Sánchez i Nogué, V., van Niel, E. W., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2016). Adaptation to low pH and lignocellulosic inhibitors resulting in ethanolic fermentation and growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Amb Express*, 6, 1-13.  
<https://doi.org/10.1186/s13568-016-0234-8>
- Nawaj Alam, S., Singh, B., & Guldhe, A. (2021). Aquatic weed as a biorefinery resource for biofuels and value-added products: Challenges and recent advancements. *Cleaner Engineering and Technology*, 4, 100235. <https://doi.org/10.1016/J.CLET.2021.100235>

- Nazir, A., Usmani, M. Z., Nasir, A., Jabbar, S., & Aslam, M. (2023). Bioethanol production from marine macroalgae waste: Optimisation of thermal acid hydrolysis. *Waste and Biomass Valorization*. <https://doi.org/10.1007/s12649-023-02320-3>
- Nguyen Thi, B. T., Ong, L. K., Nguyen Thi, D. T., & Ju, Y. H. (2017). Effect of subcritical water pretreatment on cellulose recovery of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 71, 55–61. <https://doi.org/10.1016/J.JTICE.2016.12.028>
- Nigam, P. S. (2002). Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. *Journal of Biotechnology*, 97(2), 107-116. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00013-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00013-5)
- Ningthoujam, R., Jangid, P., Yadav, V. K., Sahoo, D. K., Patel, A., & Dhingra, H. K. (2023). Bioethanol production from alkali-pretreated rice straw: effects on fermentation yield, structural characterization, and ethanol analysis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1243856. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1243856>
- Ocreto, J., Chen, W., Ubando, A., Park, Y., Kumar, A., Ashokkumar, V., Sik, Y., Kwon, E., Rollon, A. & De Luna, M. (2021). A critical review on second- and third-generation bioethanol production using microwaved-assisted heating (MAH) pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 152, 111679. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111679>

- Offei, F., Mensah, M., Thygesen, A., & Kemausuor, F. (2018). Seaweed Bioethanol Production: A Process Selection Review on Hydrolysis and Fermentation. *Fermentation* 2018, Vol. 4, Page 99, 4(4), 99. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION4040099>
- Oliveira, L. A., Souza, W., de Souza, J., & Silva, M. (2014). Pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production aiming at the Brazilian scenario. *Chemical Engineering Transactions*, 38, 481-486. <https://doi.org/10.1098/rspa.2020.0351>
- Olsson, L., & Hahn-Hägerdal, B. (1996). Fermentation of pentose and hexose sugars by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology*, 17(2), 95-100.
- Organismo Supervisor de la Inversión de Energía y Minería. (2015). La industria de los hidrocarburos líquidos en el Perú: 20 años de aporte al desarrollo del país. [https://www.osinergmin.gob.pe/seccion/centro\\_documental/Institucional/Estudios\\_Economicos/Libros/Libro-industria-hidrocarburos-liquidos-Peru.pdf](https://www.osinergmin.gob.pe/seccion/centro_documental/Institucional/Estudios_Economicos/Libros/Libro-industria-hidrocarburos-liquidos-Peru.pdf)
- Organismo Supervisor de la Inversión de Energía y Minería. (2017). Reporte Semestral del Monitoreo del Mercado de Hidrocarburos - Primer Semestre del 2017. [https://www.osinergmin.gob.pe/seccion/centro\\_documental/Institucional/Estudios\\_Economicos/Reportes\\_de\\_Mercado/RSMMH-I-2017.pdf](https://www.osinergmin.gob.pe/seccion/centro_documental/Institucional/Estudios_Economicos/Reportes_de_Mercado/RSMMH-I-2017.pdf)
- Ortiz, A. (2023). *Evaluación del potencial de fitorremediación de Phragmites australis y Baccharis latifolia empleadas como barrera biológica en humedales artificiales para la remoción de mercurio en el efluente procedente de una planta de beneficio de oro en el Anexo Secocha – Arequipa* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de San Agustín.

<https://repositorio.unsa.edu.pe/bitstreams/2dc00380-5085-4335-90b8-c7b637d9ddc2/download>

- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. *Bioresource Technology*, 74(1), 17-24. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3)
- Pardilhó, S., Oliveira, J., Pires, J. C., & Maia Dias, J. (2024). Bioethanol Production from Marine Macroalgae Waste: Optimisation of Thermal acid Hydrolysis. *Waste and Biomass Valorization*, 15(6), 3639–3649. <https://doi.org/10.1007/S12649-023-02320-3/TABLES/4>
- Pataro, I. M. L., da Costa, M. V. A., & Joseph, B. (2020). Closed-loop dynamic real-time optimization (CL-DRTO) of a bioethanol distillation process using an advanced multilayer control architecture. *Computers & Chemical Engineering*, 143, 107075. <https://doi.org/10.1016/J.COMPHEMENG.2020.107075>
- Phwan, C. K., Chew, K. W., Sebayang, A. H., Ong, H. C., Ling, T. C., Malek, M. A., Ho, Y. C., & Show, P. L. (2019). Effects of acids pre-treatment on the microbial fermentation process for bioethanol production from microalgae. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S13068-019-1533-5/TABLES/2>
- Phwan, C. K., Ong, H. C., & Harrison, M. D. (2014). Optimization of bioethanol production from water hyacinth: An integrated biorefinery approach. *BioResources*, 9(3), 5015-5025. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25830-y>
- Pin, L. A., Pennink, B. J. W., Balsters, H., & Sianipar, C. P. M. (2021). Technological appropriateness of biomass production in rural settings: Addressing water hyacinths (E.

- crassipes) problem in Lake Tondano, Indonesia. *Technology in Society*, 66, 101658.  
<https://doi.org/10.1016/J.TECHSOC.2021.101658>
- Pintor, L., Rivera, J., Ngangyo, M. & Rutiaga, J. (2018). "Evaluation of the chemical components of Eichhornia crassipes as an alternative raw material for pulp and paper," *BioRes.* 13(2), 2800-2813.
- Prasad, R., Chatterjee, S., Mazumder, P., Gupta, S., Sharma, S., Vairale, M., Datta, S., Dwivedi, S. & Gupta, D. (2019). Bioethanol production from waste lignocelluloses: A review on microbial degradation potential. *Chemosphere*, 231, 126065, 588-606.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.142>
- Ramaraj, R., & Unpaprom, Y. (2019). Optimization of pretreatment condition for ethanol production from *Cyperus difformis* by response surface methodology. *3 Biotech*, 9(6), 1–9. <https://doi.org/10.1007/S13205-019-1754-0/TABLES/6>
- Ramos, K. (2017). *DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD FITORREMEIADORA DE Scirpus americanus (Junco) EN AGUAS CONTAMINADAS CON ARSÉNICO, AREQUIPA- 2016* (Tesis de maestría). Universidad Continental.  
<https://repositorio.ucsm.edu.pe/server/api/core/bitstreams/31545b88-0c8c-46e2-bdd6-db8a9dc7b05e/content>
- Rezania, S., Oryani, B., Cho, J., Talaiekhosani, 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>

- Roni, K. A., Hastarina, M., & Herawati, N. (2019). Effect of time and concentration of sulfuric acid on yield bioethanol produced in making bioethanol from peat soil. *In Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1167, No. 1, p. 012056). . 10.1088/1742-6596/1167/1/012056
- Ruan, T., Zeng, R., Yin, X. Y., Zhang, S. X., & Yang, Z. H. (2016). Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) biomass as a biofuel feedstock by enzymatic hydrolysis. *BioResources*, 11(1). <https://doi.org/10.15376/biores.11.1.2372-2380>
- Sahu, O. (2021). Appropriateness of rose (*Rosa hybrida*) for bioethanol conversion with enzymatic hydrolysis: Sustainable development on green fuel production. *Energy*, 232, 120922. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2021.120922>
- Sanchez, O. J., & Cardona, C. A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99(14), 5270-5295. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.013>
- Saravanan, A., Senthil Kumar, P., Jeevanantham, S., Karishma, S., & Vo, D.-V. N. (2021). Recent advances and sustainable development of biofuels production from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 326, 126203. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126203>
- Saravanan, K., Rajendran, M., & Kathirvel, P. (2023). Utilization of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) as a Feasible Substrate for the Production of Single Cell Protein Using *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's Yeast). *Waste and Biomass Valorization*, 14(12), 4231-4242. <https://doi.org/10.1007/s12649-023-02138-z>

Sayago, U. F. C., Gómez-Caicedo, M. I., & Mercado Suárez, Á. L. (2024). Design of a sustainable system for wastewater treatment and generation of biofuels based on the biomass of the aquatic plant *Eichhornia Crassipes*. *Scientific Reports 2024 14:1*, 14(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-61239-4>

Scapini, T., dos Santos, M. S. N., Bonatto, C., Wancura, J. H. C., Mulinari, J., Camargo, A. F., Klanovicz, N., Zobot, G. L., Tres, M. V., Fongaro, G., & Treichel, H. (2021). Hydrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass for hemicellulose recovery. *Bioresource Technology*, 342, 126033. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.126033>

Shafaei, H., Taghizadeh-Alisarai, A., Abbaszadeh-Mayvan, A. & Tatari, A. (2023). Modeling and optimization of alkaline pretreatment conditions for the production of bioethanol from giant reed (*Arundo donax* L.) biomass using response surface methodology (RSM). *Biomass Conv. Bioref.* <https://doi.org/10.1007/s13399-023-04152-6>

Shanab, S. M. M., Hanafy, E. A., & Shalaby, E. A. (2018). Water Hyacinth as Non-edible Source for Biofuel Production. *Waste and Biomass Valorization*, 9(2), 255–264. <https://doi.org/10.1007/S12649-016-9816-6/FIGURES/5>

Shankar, K., Kulkarni, N. S., Sajjanshetty, R., Jayalakshmi, S. K., & Sreeramulu, K. (2020). Co-production of xylitol and ethanol by the fermentation of the lignocellulosic hydrolysates of banana and water hyacinth leaves by individual yeast strains. *Industrial Crops and Products*, 155, 112809. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2020.112809>

- Sharma, A., & Aggarwal, N. K. (2020a). Water hyacinth: A potential lignocellulosic biomass for bioethanol. *Water Hyacinth: A Potential Lignocellulosic Biomass for Bioethanol*, 1–106. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-35632-3>
- Sharma, A., & Aggarwal, N. K. (2020b). Bioethanol Production from Water Hyacinth. *Water Hyacinth: A Potential Lignocellulosic Biomass for Bioethanol*, 91–106. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-35632-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-35632-3_7)
- Sharma, A., & Aggarwal, N. K. (2020c). Water hyacinth: A potential lignocellulosic biomass for bioethanol. In C. Springer (Ed.), *Water Hyacinth: A Potential Lignocellulosic Biomass for Bioethanol* (1st ed., Vol. 2). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-35632-3>
- Sharma, A., & Aggarwal, N. K. (2020d). Pretreatment Strategies: Unlocking of Lignocellulosic Substrate. *Water Hyacinth: A Potential Lignocellulosic Biomass for Bioethanol*, 37–49. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-35632-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-35632-3_4)
- Sharma, A., Aggarwal, N., Mishra, R., Ranjan, N., Pandit, S. & Agrawal, S. (2024). Biological pretreatment of *Eichhornia crassipes* (water hyacinth) by *Alternaria alternata* ANF238 and optimization of growth factors for enhanced delignification. *Biomass Conv. Bioref.* (2024). <https://doi.org/10.1007/s13399-024-05864-z>
- Sharma, B., Larroche, C., & Dussap, C. G. (2020). Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. *Bioresource Technology*, 313, 123630. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.123630>

- Sharma, S., & Arora, A. (2020). Tracking strategic developments for conferring xylose utilization/fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology*, 70(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S13213-020-01590-9/TABLES/4>
- Sheng, Y., Lam, S. S., Wu, Y., Ge, S., Wu, J., Cai, L., Huang, Z., Le, Q. Van, Sonne, C., & Xia, C. (2021). Enzymatic conversion of pretreated lignocellulosic biomass: A review on influence of structural changes of lignin. *Bioresource Technology*, 324, 124631. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.124631>
- Shukla, A., Kumar, D., Girdhar, M., Kumar, A., Goyal, A., Malik, T., & Mohan, A. (2023). Strategies of pretreatment of feedstocks for optimized bioethanol production: distinct and integrated approaches. *Biotechnology for biofuels and bioproducts*, 16(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02295-2>
- Silvestre, W., Medeiros, F., Agostini, F., Toss, D. & Fernandez, G. (2019). Fraccionamiento de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) mediante destilación fraccionada al vacío. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 5422–5434. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04013-z>
- Singh, A., Singh, N., & Bishnoi, N. R. (2011). Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated wheat straw for fermentable sugars and ethanol production. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 3(2), 023105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.084>

- Sjulander, N., & Kikas, T. (2020). Origin, impact and control of lignocellulosic inhibitors in bioethanol production—A review. *Energies*, 13(18), 4751. <https://doi.org/10.3390/en13184751>
- Smith, W. A., Wendt, L. M., Bonner, I. J., & Murphy, J. A. (2020). Effects of storage moisture content on corn stover biomass stability, composition, and conversion efficacy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 716. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00716>
- Soda, S., Mishima, D., Inoue, D., & Ike, M. (2013). A co-beneficial system using aquatic plants: bioethanol production from free-floating aquatic plants used for water purification. *Water Science and Technology*, 67(11), 2637–2644. <https://doi.org/10.2166/WST.2013.188>
- Struik, Q., Oliveira Junior, E. S., Veraart, A. J., & Kosten, S. (2022). Methane emissions through water hyacinth are controlled by plant traits and environmental conditions. *Aquatic Botany*, 183, 103574. <https://doi.org/10.1016/J.AQUABOT.2022.103574>
- Sudhakar, M. P., Ravel, M., & Perumal, K. (2021). Pretreatment and process optimization of bioethanol production from spent biomass of *Ganoderma lucidum* using *Saccharomyces cerevisiae*. *Fuel*, 306, 121680. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2021.121680>
- Tan, I. S., Lam, M. K., Foo, H. C. Y., Lim, S., & Lee, K. T. (2020). Advances of macroalgae biomass for the third generation of bioethanol production. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 28(2), 502–517. <https://doi.org/10.1016/J.CJCHE.2019.05.012>
- Tarangan, D., Sobati, M. A., Shahnazari, S., & Ghobadian, B. (2023). Physical properties, engine performance, and exhaust emissions of waste fish oil biodiesel/bioethanol/diesel

- fuel blends. *Scientific Reports*, 13(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/S41598-023-41280-5/FIGURES/17>
- Tesfaw, A., & Assefa, F. (2014). Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization . *International Scholarly Research Notices*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/532852>
- Teixeira, G. G., & Santos, P. M. (2022). Simple and cost-effective approaches for quantification of reducing sugar exploiting digital image analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 113, 104719. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2022.104719>
- Thanigaivel, S., Priya, A. K., Dutta, K., Rajendran, S., & Vasseghian, Y. (2022). Engineering strategies and opportunities of next generation biofuel from microalgae: A perspective review on the potential bioenergy feedstock. *Fuel*, 312, 122827. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2021.122827>
- The World Bank. (2020). *World Development Indicators*. <https://databank.worldbank.org/source/world-development-indicators>
- Trejo, M., Bhuyar, P., Unpaprom, Y., Dussadee, N., & Ramaraj, R. (2022). Advancement of fermentable sugars from fresh elephant ear plant weed for efficient bioethanol production. *Environment, Development and Sustainability*, 24(5), 7377–7387. <https://doi.org/10.1007/S10668-021-01753-X/FIGURES/4>

- Tse, T. J., Wiens, D. J., & Reaney, M. J. T. (2021). Production of Bioethanol—A Review of Factors Affecting Ethanol Yield. *Fermentation* 2021, Vol. 7, Page 268, 7(4), 268. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION7040268>
- Valencia, D. (2023). *FITORREMEDIACIÓN DE CONTAMINANTES DE AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS Y LA APLICACIÓN DE BIOINDICADORES DE TOXICIDAD* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de San Agustín. <https://repositorio.unsa.edu.pe/server/api/core/bitstreams/64aa1367-5e12-4ebb-a389-d67960a37290/content>
- Vasić, K., Knez, Ž., & Leitgeb, M. (2021). Bioethanol production by enzymatic hydrolysis from different lignocellulosic sources. *Molecules*, 26(3), 753. <https://doi.org/10.3390/molecules26030753>
- Verma, S., Hashmi, S. A. R., Mili, M., Hada, V., Prashant, N., Naik, A., Rathore, S. K. S., & Srivastava, A. K. (2021). Extraction and applications of lignin from bamboo: a critical review. *European Journal of Wood and Wood Products*, 79(6), 1341–1357. <https://doi.org/10.1007/S00107-021-01743-W/TABLES/3>
- Vieira, R. M., Sanvezzo, P. B., Branciforti, M. C., & Brienzo, M. (2023). Effects of Particle Size on the Preparation of Biomass Samples for Structural Characterization. *Bioenergy Research*, 16(4), 2192–2203. <https://doi.org/10.1007/s12155-023-10587-6>
- Wang, W., Fan, L. W., & Zhou, P. (2022). Evolution of global fossil fuel trade dependencies. *Energy*, 238, 121924. <https://doi.org/10.1016/J.ENERGY.2021.121924>

- Waseem, W., Noor, R. S., & Umair, M. (2024). The anaerobic transformation of agricultural waste for bioethanol production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(13), 14163-14174. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-04143-7>
- Whangchai, K., Inta, W., Unpaprom, Y., Bhuyar, P., Adoonsook, D., & Ramaraj, R. (2021). Comparative analysis of fresh and dry free-floating aquatic plant *Pistia stratiotes* via chemical pretreatment for second-generation (2G) bioethanol production. *Bioresource Technology Reports*, 14, 100651. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100651>
- Woiciechowski, A., Neto, C. J., de Souza Vandenberghe, L., de Carvalho Neto, D. P., Novak Sydney, A. C., Letti, L. A. J., Karp, S. G., Zevallos Torres, L. A., & Soccol, C. R. (2020). Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional processing and recent advances. *Bioresource Technology*, 304, 122848. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.122848>
- Wood, I. P., Elliston, A., Ryden, P., Bancroft, I., Roberts, I. N., & Waldron, K. W. (2012). Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass and Bioenergy*, 44, 117–121. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2012.05.003>
- Wu, D., Wei, Z., Mohamed, T. A., Zheng, G., Qu, F., Wang, F., Zhao, Y., & Song, C. (2022). Lignocellulose biomass bioconversion during composting: Mechanism of action of lignocellulase, pretreatment methods and future perspectives. *Chemosphere*, 286, 131635. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.131635>

- Xiao, K., Yuan, Y., Xiao, N., Zhou, W., Yang, Q., Feng, W., & Zhu, D. (2017). Enzymatic saccharification responses of *Eichhornia crassipes*, sugarcane bagasse and *Metasequoia glyptostroboides* to two oxidation pretreatments for biofuel production. *Industrial Crops and Products*, *107*, 22–29. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2017.05.017>
- Yan, X., An, J., Zhang, L., Zhang, L., Zhou, X., & Wei, S. (2022). Ecotoxicological effects and bioaccumulation in *Eichhornia crassipes* induced by long-term exposure to triclosan. *Plant Physiology and Biochemistry*, *193*, 90-98. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.10.013>
- Yang, Y., Zhang, M., Zhao, J., & Wang, D. (2023). Effects of particle size on biomass pretreatment and hydrolysis performances in bioethanol conversion. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *13*(14), 13023–13036. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-02169-3>
- Zhang, H., Han, L., & Dong, H. (2021). An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Experimental and modeling studies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *140*, 110758. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2021.110758>
- Zhang, Q., Wei, Y., Han, H., & Weng, C. (2018). Enhancing bioethanol production from water hyacinth by new combined pretreatment methods. *Bioresource Technology*, *251*, 358–363. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.12.085>
- Zhang, Q., Weng, C., Huang, H., Achal, V., & Wang, D. (2016). Optimization of bioethanol production using whole plant of water hyacinth as substrate in simultaneous

saccharification and fermentation process. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1411.

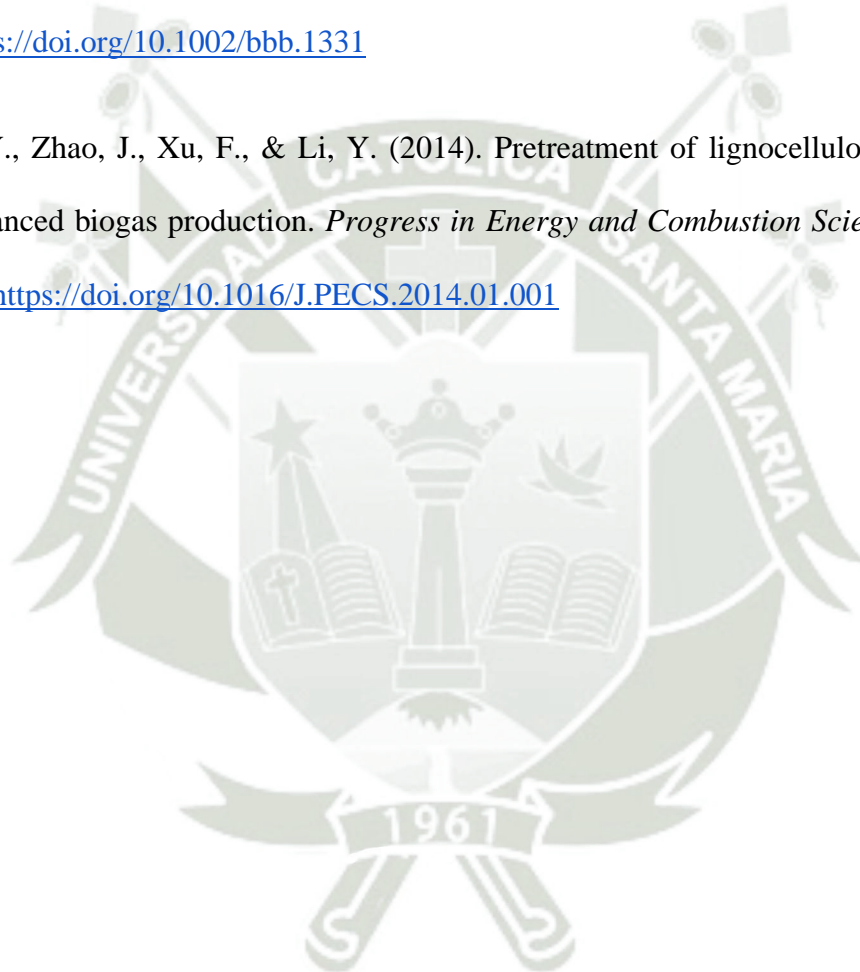
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01411>

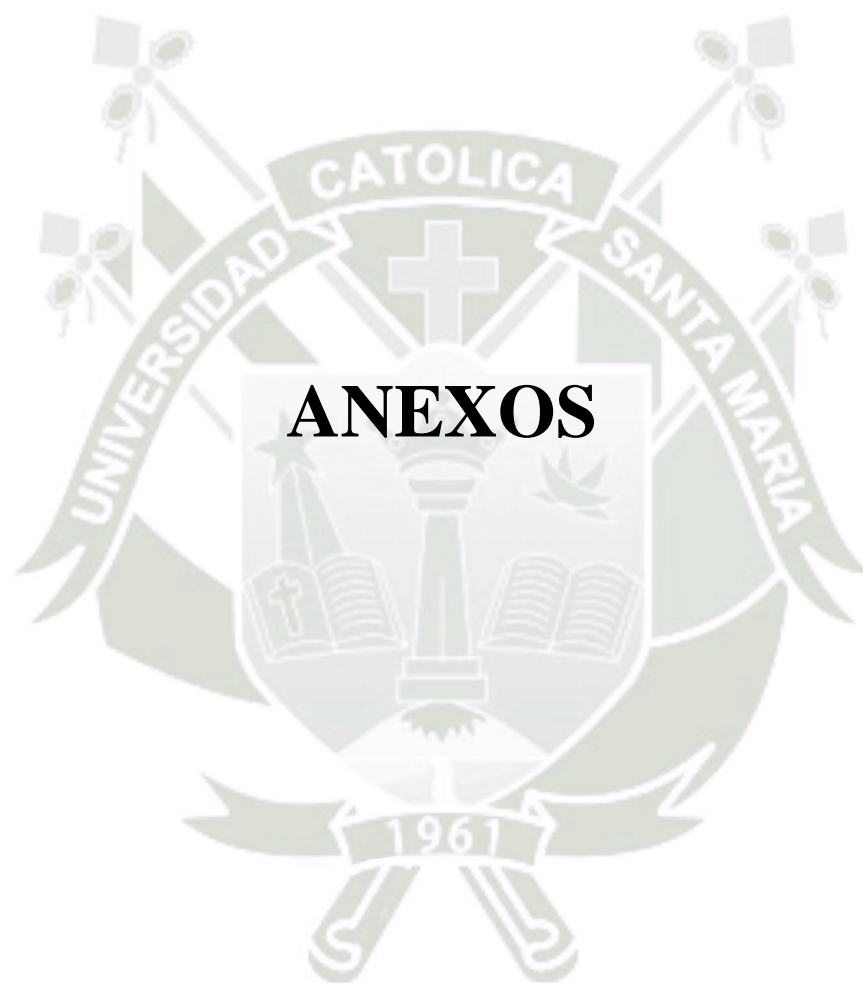
Zhao, X., Zhang, L., & Liu, D. (2012). Biomass recalcitrance. Part I: The chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(4), 465-482.

<https://doi.org/10.1002/bbb.1331>

Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., & Li, Y. (2014). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*, 42(1), 35–

53. <https://doi.org/10.1016/J.PECS.2014.01.001>





## Anexo 1. Certificado de identificación de la planta *Eichhornia crassipes*



**INSTITUTO CIENTÍFICO MICHAEL OWEN DILLON (IMOD)**

Investigación, Conservación, Educación y Transformación de Recursos

Reconocido por Resolución de Dirección General Nro. 140-2016-SERFOR/DGSPFFS



"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

### CONSTANCIA DE DETERMINACIÓN DE MUESTRAS N° 001-2022

El Director del Instituto Científico Michael Owen Dillon (IMOD).

#### HACE CONSTAR:

Que la muestra presentada por las Srtas. **Stefani Camila Gonzáles León, Alejandra Yadhira Lázaro Mamani y María Fernanda Vallenás Yrigoyen** estudiantes de Ingeniería Ambiental de la Universidad Católica de Santa María, recolectada en el distrito de Mejía, provincia de Islay, departamento de Arequipa con coordenadas de 17°07'16.4"S 71°53'21.9"W, y fue determinada taxonómicamente en las instalaciones del Herbario del Instituto Científico Michael Owen Dillon, "Herbario Sur Peruano" (HSP), y corresponde a:

**Clase:** Equisetopsida C. Agardh

**Subclase:** Magnoliidae Novák ex Takht.

**Orden:** Commelinales Mirb. ex Bercht. & J. Presl

**Familia:** Pontederiaceae Kunth

**Género:** *Eichhornia* Kunth

**Especie:** *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms

La clasificación se ha realizado según la propuesta por: *Angiosperm Phylogeny Group (APG) IV* en "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV" (2016).

Se expide la presente, a solicitud de las interesadas, para los fines que estimen conveniente.

Arequipa, 31 de enero del 2022



Dr. Blgo. Víctor Quipuscoa Silvestre  
C. B. P. N° 2484

Director del Instituto Científico Michael Owen Dillon (IMOD)

Herbario Sur Peruano (HSP)

vquipuscoas@hotmail.com

vquipuscoa@imod.org.pe



Dirección: Av. Jorge Chávez No. 610 Cercado, Arequipa - Perú  
Página web: <http://www.imod.org.pe/>  
Correo: [imod.per@gmail.com](mailto:imod.per@gmail.com)

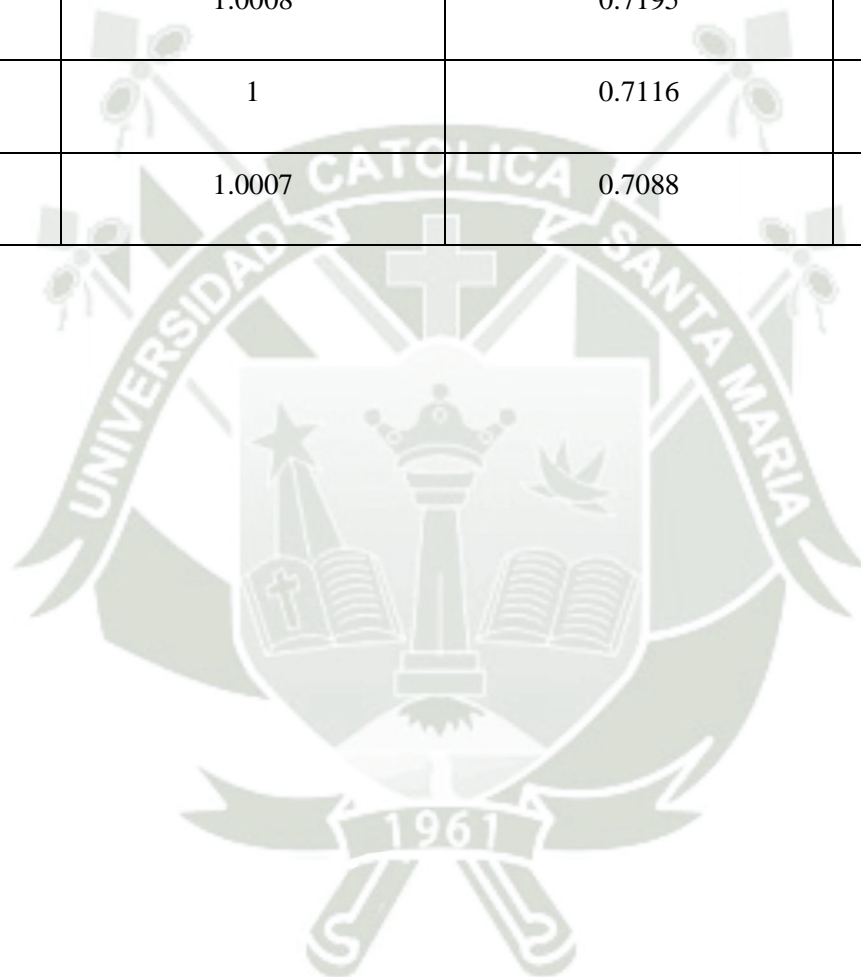
**Anexo 2.** *Porcentaje de humedad de las plantas analizadas*

	Antes del secado				Después del secado				% de humedad (total)	%Humedad hojas	%Humedad tallos	%Humedad raíces
	Hojas (g)	Tallos (g)	Raíces (g)	Total	Hojas (g)	Tallos (g)	Raíces (g)	Total				
1	6.97	28.85	7.04	42.86	0.95	1.33	0.62	2.9	93.23	86.37	95.39	91.193
2	16.45	118.49	39.16	174.1	3.56	6.58	4.16	14.3	91.79	78.36	94.45	89.377
3	6.53	70	16.95	93.48	3.07	3.89	1.66	8.62	90.78	52.99	94.44	90.206
4	5.57	43.61	6.45	55.63	1.32	2.11	0.69	4.12	92.59	76.30	95.16	89.302
5	8.71	25.6	6.54	40.85	0.94	1.39	0.85	3.18	92.22	89.21	94.57	87.003
6	6.87	32.96	8.9	48.73	1.03	1.31	0.61	2.95	93.95	85.01	96.03	93.146
7	5.83	44.53	16.77	67.13	1.7	2.34	1.65	5.69	91.52	70.84	94.75	90.161
8	7.07	34.08	11.98	53.13	1.51	1.7	1.33	4.54	91.45	78.64	95.01	88.898
9	4.23	16.45	3.88	24.56	0.61	0.64	0.32	1.57	93.61	85.58	96.11	91.753

10	7.88	32.1	7.12	47.1	1.1	1.29	0.62	3.01	93.61	86.04	95.98	91.292
11	11.18	68.91	14.89	94.98	2.28	3.54	1.5	7.32	92.29	79.61	94.86	89.926
12	11.5	79.48	32.42	123.4	2.9	5.16	3.63	11.69	90.53	74.78	93.51	88.803
13	9.88	53.83	11.56	75.27	1.87	2.47	1.09	5.43	92.79	81.07	95.41	90.571
14	8.08	31.86	7.35	47.29	1.05	1.3	0.62	2.97	93.72	87.00	95.92	91.565
15	12.8	32.38	11.43	56.61	1.39	2.03	0.89	4.31	92.39	89.14	93.73	92.213
16	3.47	9.11	2.36	14.94	0.4	0.54	0.14	1.08	92.77	88.47	94.07	94.068
			Total	1060.06			Total	83.68	92.45	80.59	94.96	90.592

**Anexo 3.** *Tabla de resultados de caracterización de la biomasa (Jacinto de agua)*

N°	Peso de la muestra antes de la extracción soxhlet (gr)	Peso de la muestra después de la extracción soxhlet (gr)	Diferencia (Peso de extractivos)
1	1.0006	0.7209	0.2797
2	1.0008	0.7195	0.2813
3	1	0.7116	0.2884
4	1.0007	0.7088	0.2919

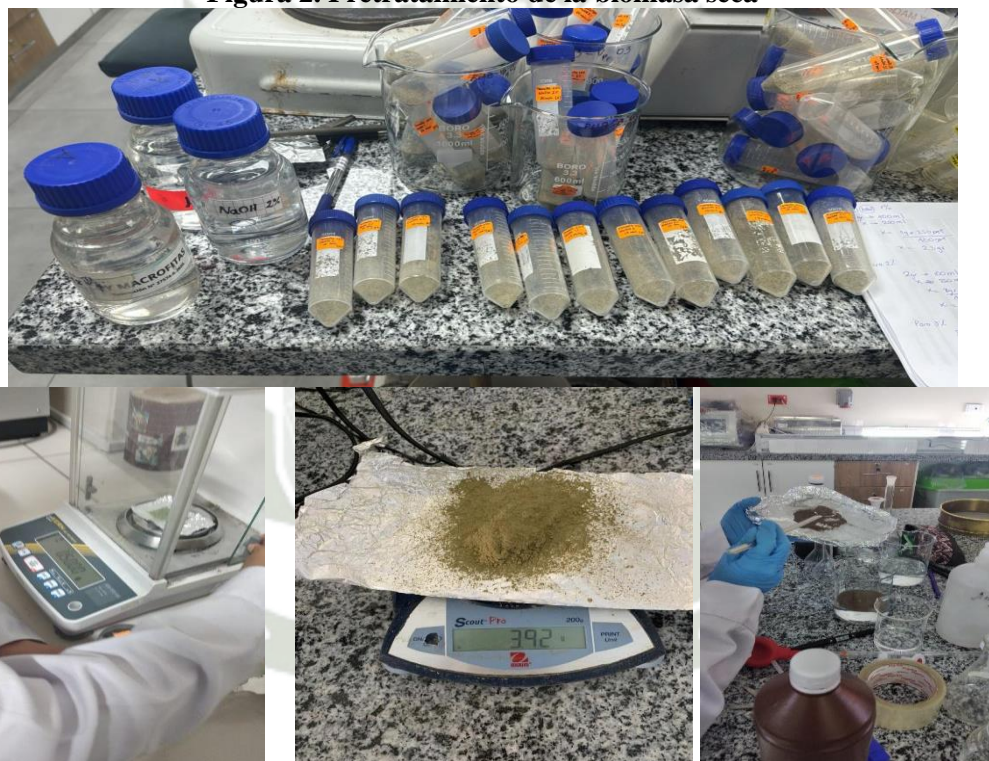


Anexo 4. Panel fotográfico de la experimentación

**Figura 1. Secado, triturado y tamizado de la biomasa**



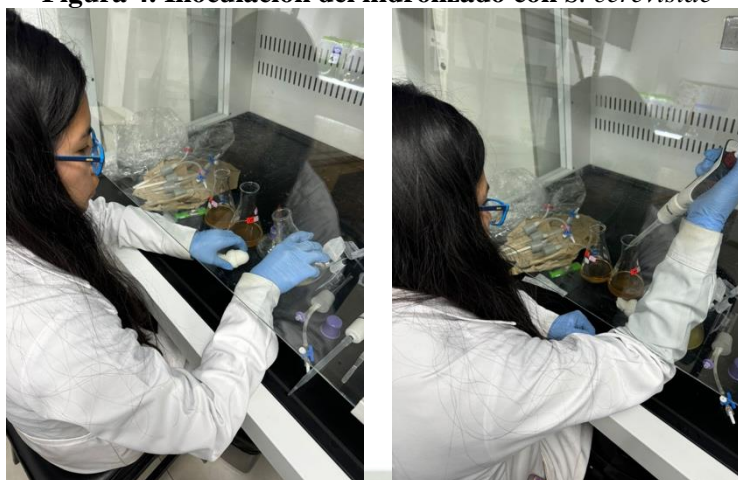
**Figura 2. Pretratamiento de la biomasa seca**



**Figura 3. Obtención del hidrolizado de la biomasa pretratada**



**Figura 4. Inoculación del hidrolizado con *S. cerevisiae***



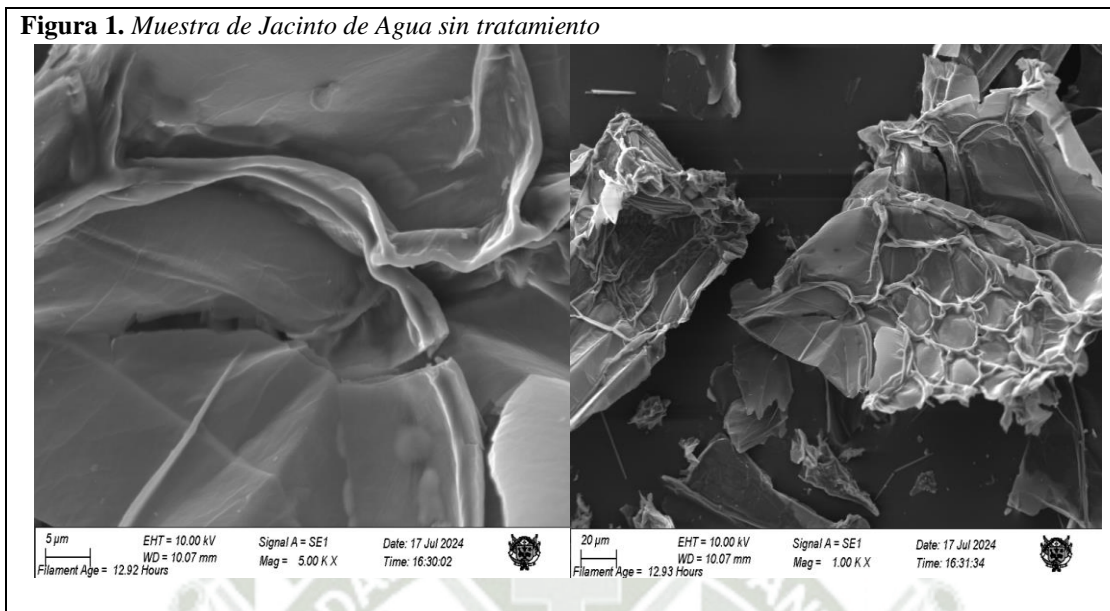
**Figura 5. Diseño del sistema de fermentación**



**Figura 6. Destilación del fermentado**



**Anexo 5. Resultados de Caracterización por Microscopía Electrónica de Barrido**





VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN



Universidad Católica  
de Santa María

**INFORME DE ENSAYO**

**N° DE INFORME: ANA17G24.000027A**

**Nombre del Cliente** : Universidad Católica de Santa María  
**Dirección del Cliente** : Urb. San José, San José s/n, Yanahuara  
**Ruc** : 20141637941  
**Condición del Muestreado** : POR EL CLIENTE  
**Descripción** : M1- Jacinto de agua, sin tratamiento  
**Tamaño de muestra** : 0.5g  
**Fecha de Recepción** : 17/07/2024  
**Fecha de Inicio del Ensayo** : 17/07/2024  
**Fecha de Emisión de Informe** : 17/07/2024  
**Página** : 1 de 1

**I. PARÁMETROS DE ANÁLISIS:**

PARÁMETROS	
Software	SmartSEM ZEISS
Voltaje	10 Kv
Detector	Electrones secundarios
Modo	Alto vacío
Recubierta	Oro-paladio
Modelo del equipo	EVO 10MA CARL ZEISS

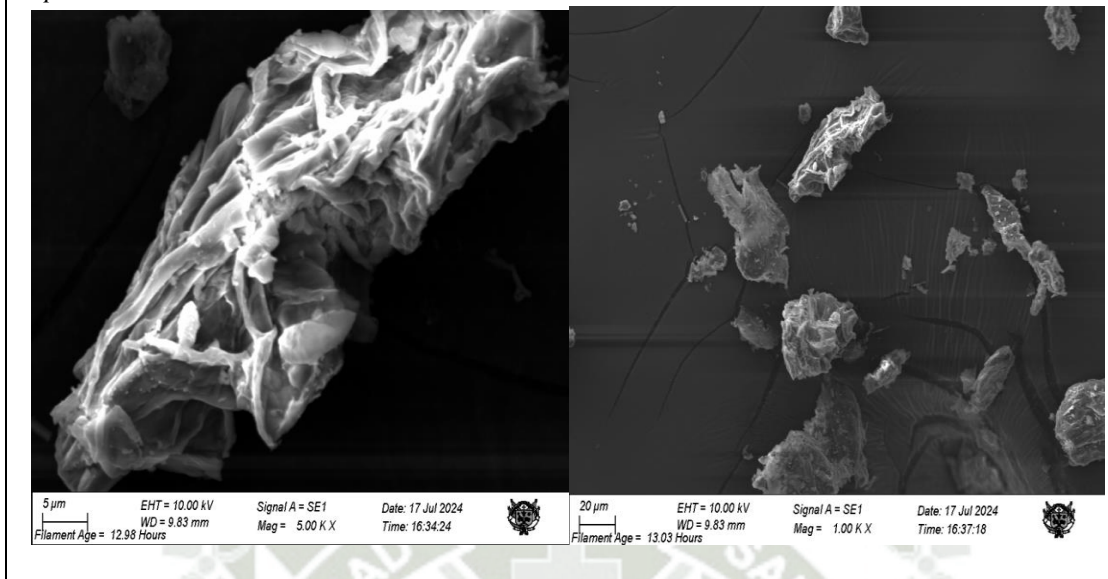
**OBSERVACIONES:**

- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Microscopía Electrónica.



QF. Tiffany L. Vincent Lozano  
Asistente de Laboratorio  
Laboratorio de Microscopía Electrónica

**Figura 2.** Muestra de Jacinto de Agua con pretratamiento a NaOH 1% con 30 minutos a explosión a vapor





Universidad Católica  
de Santa María



VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN

**INFORME DE ENSAYO**  
**N° DE INFORME: ANA17G24.000027B**

---

**Nombre del Cliente** : Universidad Católica de Santa María  
**Dirección del Cliente** : Urb. San José, San José s/n, Yanahuara  
**Ruc** : 20141637941  
**Condición del Muestreado** : POR EL CLIENTE  
**Descripción** : M2- Jacinto de agua, NaOH 1%, 30min explosión al vapor  
**Tamaño de muestra** : 0.5g  
**Fecha de Recepción** : 17/07/2024  
**Fecha de Inicio del Ensayo** : 17/07/2024  
**Fecha de Emisión de Informe** : 17/07/2024  
**Página** : 1 de 1

**I. PARÁMETROS DE ANÁLISIS:**

PARÁMETROS	
Software	SmartSEM ZEISS
Voltaje	10 Kv
Detector	Electrones secundarios
Modo	Alto vacío
Recubierta	Oro-paladio
Modelo del equipo	EVO 10MA CARL ZEISS

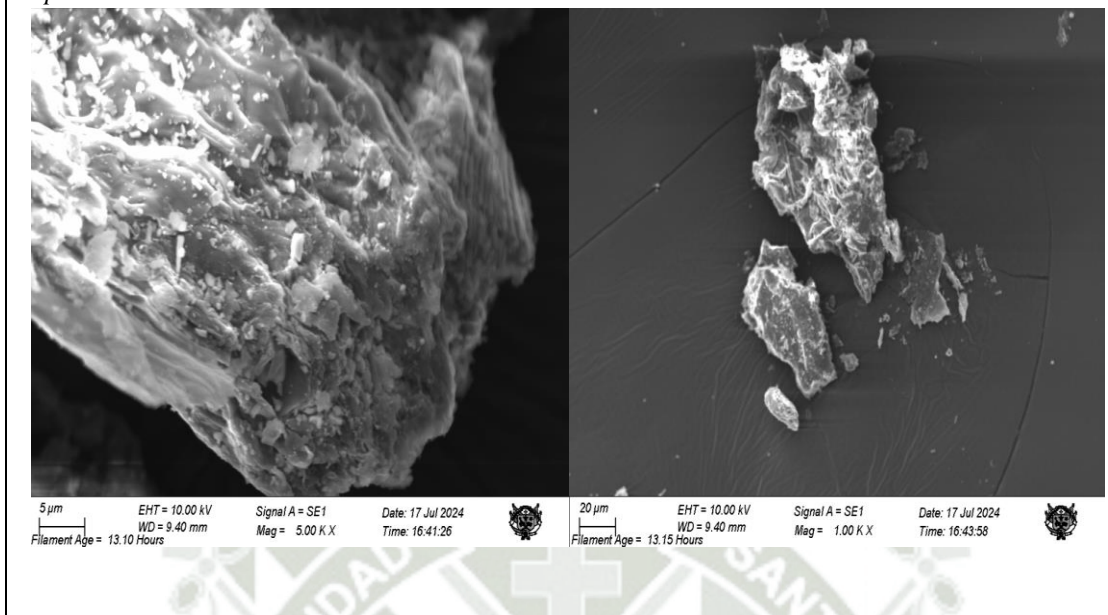
**OBSERVACIONES:**


- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Microscopía Electrónica.





**QF. Tiffany L. Vincent Lozano**  
Aspirante de Laboratorio  
Laboratorio de Microscopía Electrónica

**Figura 3.** Muestra de Jacinto de Agua con pretratamiento de NaOH al 3% con 15min de explosión al vapor




Universidad Católica  
de Santa María


VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN

**INFORME DE ENSAYO**

**N° DE INFORME: ANA17G24.000027C**

---

**Nombre del Cliente** : Universidad Católica de Santa María

**Dirección del Cliente** : Urb. San José, San José s/n, Yanahuara

**Ruc** : 20141637941

**Condición del Muestreado** : POR EL CLIENTE

**Descripción** : M3- Jacinto de agua, NaOH 3%, 15min explosión al vapor

**Tamaño de muestra** : 0.5g

**Fecha de Recepción** : 17/07/2024

**Fecha de Inicio del Ensayo** : 17/07/2024

**Fecha de Emisión de Informe** : 17/07/2024

**Página** : 1 de 1

**I. PARÁMETROS DE ANÁLISIS:**

PARÁMETROS	
Software	SmartSEM ZEISS
Voltaje	10 Kv
Detector	Electrones secundarios
Modo	Alto vacío
Recubierta	Oro-paladio
Modelo del equipo	EVO 10MA CARL ZEISS

**OBSERVACIONES:**

- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Microscopia Electrónica.