



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

---

**Cambios en la composición del lirio acuático  
(*Eichhornia crassipes*) debidos a su grado de  
madurez y a su transformación biotecnológica**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN  
Tesis  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO BIOQUÍMICO  
P R E S E N T A

**JUÁREZ LUNA GREGORIO NICOLÁS**



**México, D.F.**

**2011**

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA PLANTA PILOTO DE PRODUCTOS LÁCTEOS DEL DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL Y EN LA PLANTA DE FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA – IZTAPALAPA BAJO LA ASESORÍA DE LA I.BQ. MARÍA TERESA FAVELA TORRES Y COASESORÍA DE LA DRA. ISABELLE GAIME-PERRAUD.**

## DEDICATORIA

A **México**, por darme la oportunidad de nacer, ver la luz y crecer en una tierra llena de virtudes y de gente que día a día buscar salir adelante a pesar de tiempos difíciles.

Al **Instituto Politécnico Nacional**, institución que se encargó de formarme como una persona responsable y con miras a ser un mejor hombre viviendo siempre en congruencia con la ética y los valores de ser un ingeniero politécnico, además de inculcarme que el guinda no se lleva en la piel, el guinda se lleva en el corazón...

A la **Universidad Autónoma Metropolitana**, que me ha abierto las puertas y recibido como uno más de sus alumnos para guiarme a ser una mejor persona.

A mis padres, **María Teresa Luna y Paulino Juárez**, a mi hermana **Erandi Juárez** y familia (Mario, Brayan y Erick) por su apoyo incondicional, sus regaños y por ser la columna central de mi proyecto de vida. Aunque no lo crean, los **AMO** con todo mi corazón.

A **Alejandra Anaya Domínguez**, que ha sido y siempre será una mujer ejemplar y dueña de mi más profunda admiración y cariño, **TE AMO CON TODA MI FUERZA** y aunque mi camino no sea el tuyo siempre viviré tratando de apoyarte, guiarte y hacer cualquier clase de locura para verte bien, para verte sonreír y, como siempre, desearte que seas rabirosamente feliz, te lo mereces. ¡Gracias!

A la señora **Lourdes Domínguez** que ha sido un ejemplo de vida, que me abrió las puertas de su casa, me cuidó como un hijo y me dio la confianza de cuidar a su más preciado tesoro. Gracias y que siempre tenga una vida llena de bendiciones. La quiero mucho...

A la señora **Gregoria Cayetano<sup>†</sup>**, que fue una fuente inagotable de aprendizaje, amiga, cómplice y, en verdad, un placer convivir con ella. Aunque ya no está con nosotros solo puedo creer en aquella frase de nuestros antepasados que dice "A los difuntos no se les entierra, a los difuntos se les siembra para que vayan con Tonantzin, nuestra madre tierra para que cosechemos vida por toda la eternidad". En donde quiera que esté, la quiero mucho.

A mis sinodales, Dra. Gloria Dávila Ortiz y al Dr. Eliseo Cristiani Urbina por tomarse el tiempo y la dedicación de revisar mi trabajo y hacer correcciones y sugerencias muy valiosas.

A mi maestra de toda la vida Teresa Favela, por sus consejos, por su preocupación auténtica y porque siempre me ha cuidado y dirigido a ser una persona de excelencia. La quiero mucho.

A la Dra. Isabelle Gaimé - Perraud, gracias por sus enseñanzas, por sus historias tan amenas y sobre todo por su compromiso con mi formación. A pesar del poco tiempo de conocerla puedo decir que es un placer trabajar con Usted.

Al Dr. Ernesto Favela, que me ha hecho ver la vida desde otra perspectiva, gracias por tu preocupación, tus palabras y por aceptarme dentro del grupo de trabajo. Te admiro.

A mis amigos de toda la vida, Hugo Tenjay Domínguez y José Juan Villar con quienes crecí, lloré, reí y a quienes les puedo decir que los quiero.

A mis amigos de la Planta Piloto 4: Mari Jo Serrano, Daniela Nava, Claudia Wui, Rosy Vega, Ruth Peña, Rodrigo Melgarejo, Miguel Arellano, Pedro López que me han hecho reír, me han acompañado ya quienes he aprendido a querer y respetar en unos cuantos meses de conocerlos.

Es difícil decir todos los nombres pero sé que quienes han estado conmigo saben que los aprecio y siempre podrán contar conmigo.

**A todos...**

**¡MIL GRACIAS!**

## ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO	TÍTULO	PÁGINA
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1.	CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL LIRIO ACUÁTICO.....	1
1.2.	MORFOLOGÍA.....	3
1.3.	REPRODUCCIÓN.....	5
1.4.	PROBLEMÁTICA AMBIENTAL, DE SALUD Y ECONÓMICA....	6
1.5.	MÉTODOS DE CONTROL.....	9
1.6.	POSIBLES USOS Y APLICACIONES.....	11
1.6.1.	AGENTE DE BIOREMEDIACIÓN.....	11
1.6.2.	CARBONIZACIÓN.....	12
1.6.3.	PRODUCCIÓN DE ETANOL (BIOETANOL).....	12
1.6.4.	PRODUCCIÓN DE BIOGÁS.....	13
1.6.5	COMPOSTA.....	14
1.7.	SITUACIÓN DEL LIRIO ACUÁTICO EN MÉXICO.....	15
1.8	COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL LIRIO ACUÁTICO.....	18
<b>2.</b>	<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>20</b>
2.1.	<i>"Thermochemical pretreatment of water hyacinth for improved biomethanation".....</i>	20
2.2.	<i>"Bioconversion of water-hyacinth (<i>Eichhornia crassipes</i>) hemicellulose acid hydrolysis to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast".....</i>	21
2.3.	<i>"Appropriate technology for bioconversion of water hyacinth (<i>Eichhornia crassipes</i>) to liquid ethanol: Future prospects for community strengthening and sustainable development".....</i>	22
2.4.	<i>"Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth".....</i>	23
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>24</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
4.1.	OBJETIVO GENERAL.....	25
4.2.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	25

## ÍNDICE GENERAL

<b>5.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
5.1.	MATERIA PRIMA.....	26
5.2.	MATERIALES Y EQUIPO.....	26
5.3.	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	28
5.4.	REACTIVOS.....	28
<b>6.</b>	<b>DESARROLLO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>29</b>
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>37</b>
7.1.	CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DEBIDOS AL GRADO DE MADUREZ.....	37
7.2.	SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES A Y B DE LA HEMICELULOSA DE LIRIO ACUÁTICO.....	59
7.3.	CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DEBIDO AL TRATAMIENTO BIOTECNOLÓGICO.....	61
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>73</b>
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>76</b>
	<b>ANEXO I.....</b>	<b>81</b>
	<b>ANEXO II.....</b>	<b>84</b>
	<b>ANEXO III.....</b>	<b>87</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>PÁGINA</b>
1.1.1.	El lirio acuático es una planta libre flotadora pero también es capaz de crecer en una amplia variedad de suelos como arena húmeda.....	2
1.2.1.	Morfología del lirio acuático.....	4
1.2.2	Sección transversal de un pecíolo en donde se observan los espacios llenos de aire.....	4
1.3.1.	Reproducción por estolones de <i>Eichhornia crassipes</i> vía vegetativa.....	5
1.3.2.	Semillas de <i>Eichhornia crassipes</i> .....	6

## ÍNDICE DE FIGURAS

1.4.1	El rápido y congestionado crecimiento del lirio acuático provoca serios problemas.....	8
1.5.1.	Cosecha mecánica de lirio acuático.....	9
1.6.1.	Lirio acuático como agente de bioremediación.....	12
1.7.1.	Estados de la República en donde se ha registrado la presencia de lirio acuático.....	16
6.1.	Diagrama de flujo para llevar a cabo el análisis del lirio acuático....	29
6.2.	Hoja y tallo (de izquierda a derecha) de lirio acuático secado a 60°C molido.....	32
6.3.	Método de Soxhlet para determinación de extractivos.....	33
6.4.	Equipo HPLC utilizado para determinar monómeros (C <sub>5</sub> y C <sub>6</sub> ) e inhibidores.....	35
7.1.1.	Principales precursores en la biosíntesis de lignina.....	47
7.1.2.	Precursores de las hemicelulosas.....	50
7.1.3.	La celobiosa es la unidad fundamental de la celulosa.....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
1.1.1.	Clasificación taxonómica del lirio acuático.....	1
1.1.2.	Principales cuerpos acuíferos infestados por lirio acuático en países en desarrollo.....	2
1.5.1.	Principales métodos de control del crecimiento del lirio acuático...	10
1.8.1.	Composición química del lirio acuático.....	18
7.1.1.	Resultados del análisis de humedad.....	37
7.1.2.	Resultados para el cálculo de sólidos totales.....	38
7.1.10	Composición promedio de las fracciones tallo y hoja y lirio TEMA irradiado.....	57
7.1.11	Composición promedio de la fracción tallo de lirio acuático.....	58
7.1.12	Composición promedio de la fracción hoja de lirio acuático.....	58
7.2.1.	Resultados de la extracción de las fracciones A y B de hemicelulosa en tallo y hoja.....	59
7.3.1.	Resultados del análisis de humedad.....	62
7.3.2.	Resultados del análisis de sólidos totales.....	62
7.3.10.	Composición promedio del lirio acuático antes y después del tratamiento.....	72

## ÍNDICE DE TABLAS ANEXO I

7.1.3.	Resultados del análisis de extractivos.....	81
7.1.4.	Resultados del análisis de azúcares reductores en el extracto acuoso.....	81
7.1.5.	Resultados del análisis de azúcares totales en el extracto acuoso...	82
7.1.6.	Resultados del análisis de cenizas.....	82
7.1.7.	Resultados del análisis de lignina.....	83
7.1.8.	Resultados del análisis de hemicelulosa.....	83
7.1.9.	Resultados del análisis de celulosa.....	84

## ÍNDICE DE TABLAS ANEXO II

7.3.3.	Resultados del análisis de extractivos.....	84
7.3.4.	Resultados del análisis de azúcares reductores en el extracto acuoso.....	85
7.3.5.	Resultados del análisis de azúcares totales en el extracto acuoso..	85
7.3.6.	Resultados del análisis de cenizas.....	85
7.3.7.	Resultados del análisis de lignina.....	86
7.3.8.	Resultados del análisis de hemicelulosa.....	86
7.3.9.	Resultados del análisis de celulosa.....	86

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA	TÍTULO	PÁGINA
7.1.1.	Contenido de extractivos en tallo y hoja maduros y lirio TEMA irradiado.....	39
7.1.2.	Cambios en el contenido de extractivos debidos al grado de madurez, a) tallo y b) hoja.....	41
7.1.3.	Contenido de azúcares reductores en el extracto acuoso de tallo y hoja maduros, y lirio TEMA irradiado.....	42
7.1.4.	Cambios en el contenido de azúcares reductores en el extracto acuoso debidos al grado de madurez, a) tallo y b) hoja.....	42
7.1.5.	Contenido de azúcares totales en el extracto acuoso de tallo y hoja maduros y lirio TEMA irradiado.....	43
7.1.6.	Cambios en el contenido de azúcares totales en el extracto acuoso debidos al grado de madurez, a) tallo y b) hoja.....	44
7.1.7.	Contenido de cenizas en tallo y hoja maduros, y lirio TEMA irradiado.....	45
7.1.8.	Cambios en el contenido de cenizas debidos al grado de madurez, a) tallo y b) hoja.....	46

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

7.1.9.	Contenido de lignina en tallo y hoja maduros, y lirio TEMA irradiado.....	48
7.1.10.	Cambios en el contenido de lignina debidos al grado de madurez, a) tallo y b) hoja.....	49
7.1.11.	Contenido de hemicelulosa en tallo y hoja maduros, y lirio TEMA irradiado.....	51
7.1.12.	Cambios en el contenido de hemicelulosa debidos al grado de madurez, a) tallo y b) hoja.....	52
7.1.13.	Contenido de celulosa en tallo y hoja maduros, y lirio TEMA irradiado.....	55
7.1.14.	Cambios en el contenido de celulosa debidos al grado de madurez, a) tallo y b) hoja.....	56
7.2.1.	Contenido de hemicelulosa A y B en tallo y hoja maduros.....	60
7.3.1.	Cambios en el contenido de extractivos debidos al tratamiento biotecnológico.....	63
7.3.2.	Cambios en el contenido de azúcares reductores en el extracto acuoso debidos al tratamiento biotecnológico.....	65
7.3.3.	Cambios en el contenido de azúcares totales en el extracto acuoso debidos al tratamiento biotecnológico.....	66
7.3.4.	Cambios en el contenido de cenizas debidos al tratamiento biotecnológico.....	67
7.3.5.	Cambios en el contenido de lignina debidos al tratamiento biotecnológico.....	68
7.3.6.	Cambios en el contenido de hemicelulosa debidos al tratamiento biotecnológico .....	69
7.3.7.	Cambios en el contenido de celulosa debidos al tratamiento biotecnológico .....	70

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL LIRIO ACUÁTICO

El lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) es una planta hidrófita libre flotadora que pertenece a la familia de las *Pontederiaceae* (Malik, 2007). En la Tabla 1.1.1 se resume su clasificación taxonómica.

---

**Tabla 1.1.1. Clasificación taxonómica del lirio acuático<sup>a</sup>.**

Reino:	Plantae.
División:	Magnoliophyta.
Clase:	Liliopsida.
Orden:	Commelinales.
Familia:	Pontederiaceae.
Género:	<i>Eichhornia</i> .
Especie:	<i>E. crassipes</i> .

---

<sup>a</sup> Tomada de: [http://es.wikipedia.org/wiki/Eichhornia\\_crassipes](http://es.wikipedia.org/wiki/Eichhornia_crassipes).

Esta planta es originaria del Amazonas en Sudamérica, en donde se mantiene bajo control por la acción de depredadores naturales y por las inundaciones anuales que arrastran las matas de lirio hacia el mar en donde no es capaz de sobrevivir (Lindsey y Hirt, 2000); sin embargo, debido a la mano del hombre, el lirio acuático se ha dispersado por todas las zonas tropicales del mundo (Gunnarsson y Mattsson, 2007). En la tabla 1.1.2 se mencionan los principales cuerpos acuíferos invadidos por esta planta en Latinoamérica. Su rápido y congestionado crecimiento (hasta de 60 Kg m<sup>-2</sup>) ha provocado que actualmente se le considere como maleza nociva y esté atrayendo la atención global debido a que estas características provocan un fuerte impacto al ambiente, a la salud humana y al desarrollo económico (Malik, 2007). Los intentos por controlar el crecimiento de esta maleza han tenido un costo alto y solo han sido soluciones temporales (Gunnarsson y Mattsson, 2007). Por su rápido crecimiento, que es una característica muy apreciada en cualquier cultivo, y su capacidad de remover contaminantes de los cuerpos

acuíferos, el lirio acuático también puede ser considerado como una materia prima potencial para diferentes industrias tales como: la de los alimentos funcionales, la de biocombustibles (etanol y diesel), en investigación para bio y fito - remediación, entre otras (Gunnarsson y Mattsson, 2007; Malik, 2007).

**Tabla 1.1.2. Principales cuerpos acuíferos infestados por lirio acuático en países en desarrollo<sup>a</sup>.**

Región: Latinoamérica y el Caribe.

País	Sitio infestado y región.
Bolivia	Presa San Jacinto, Tarija.
Colombia	Laguna exterior de la Amazonia.
Cuba	Presas comerciales el parte central y oriente del país.
México	Lagos de Chapala y Guadalupe, río Santiago y diversas presas en el centro y sur del país.

<sup>a</sup> Adaptada de: Labrada, 1996

El lirio acuático crece preferentemente en cuerpos de agua nutricionalmente enriquecidos, pero también es capaz de hacerlo sobre suelos húmedos. (Fig. 1.1.1).



Figura. 1.1.1 El lirio acuático es una planta libre flotadora pero también es capaz de crecer en una amplia variedad de suelos como arena húmeda.

<sup>a</sup> Tomada de: <http://veracruzinforma.com.mx/2010/06/chiquinando-limpia-el-lirio-acuatico-en-tlalixcoyan/>.

<sup>b</sup> Tomada de: Lindsey y Hirt, 2000.

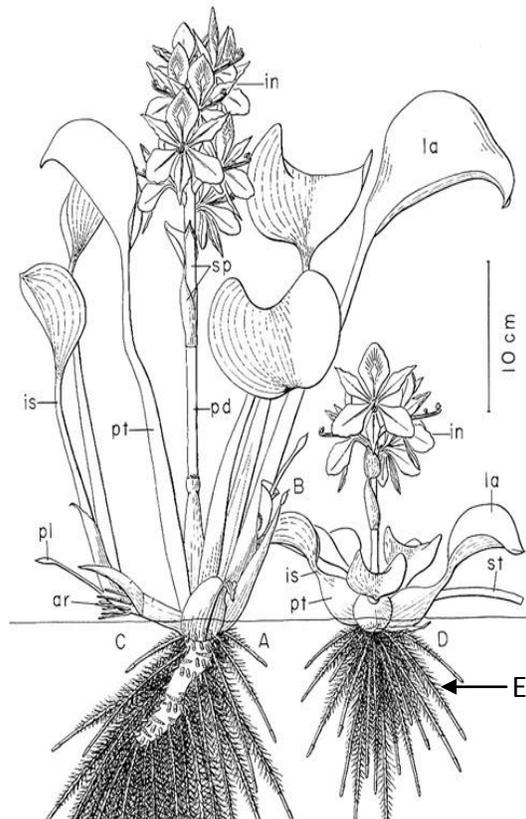
El lirio acuático puede tolerar muy bien amplias variaciones en la concentración de nutrientes, en la temperatura y en los niveles de pH. El pH óptimo para el crecimiento del lirio acuático se encuentra entre 6 – 8, crece en un rango de 1 – 40°C, aunque parece ser que es sensible a bajas temperaturas (< 1°C), presenta su óptimo a 25 – 27.5°C (*Malik, 2007*) y a temperaturas mayores a 33°C se reduce drásticamente su tasa de reproducción (*Gakwavu, 2007*). Su tasa de crecimiento se ve favorecida a mayores concentraciones de nitrógeno (*Heard y Winterton, 2000*). Altas concentraciones de sal (6 – 8%) son letalmente inhibitorias para su crecimiento (*Malik, 2007*). Además, una baja humedad relativa del aire de 15 – 40% puede ser un factor limitante para su crecimiento (*Gakwavu, 2007*).

## 1.2. MORFOLOGÍA

Como ya se mencionó, el lirio acuático es una planta libre flotadora, perene, que posee hojas de color verde brillante, espigas florales de color violeta o amarillas y una raíz fibrosa que puede llegar a medir hasta 3m de largo (*Lindsey y Hirt, 2000; Gakwavu, 2007*).

Los pecíolos son los tallos de las hojas y los estolones son las estructuras que generan nuevos individuos. Las inflorescencias poseen entre 8 y 15 flores. Los frutos son unas pequeñas cápsulas que contienen alrededor de 450 semillas.

Las raíces son fibrosas y poseen una gran cantidad de pequeñas hebras que funcionan como una especie de red para captar nutrientes y algunas partículas suspendidas. Esta característica, aunada a su alta eficiencia en el uso de la energía solar explican su asombrosa tasa de crecimiento (*Lindsey y Hirt, 2000*). Las plantas jóvenes crecen en las orillas y están enraizadas, pero conforme crecen se van juntando debido al empuje del viento hasta que forman matas o balsas que pueden alcanzar hasta 45ha de tamaño. En la figura 1.2.1 se muestra la morfología del lirio acuático.



- A) Pecíolo atenuado en forma de rosetón producido bajo condiciones de alta densidad poblacional.
- B) Brote axilar en expansión.
- C) Un "ramet" en desarrollo.
- D) Pecíolo bulboso en forma de rosetón producido bajo condiciones de baja densidad poblacional.
- E) Raíz.

**Abreviaturas:**

- ar: Raíces adventicias.
- in: Inflorescencia.
- is: Istmo de las hojas.
- la: Hojas.
- pl: Hojas primarias.
- pd: Pedúnculo de la espiga floral.
- pt: Pecíolo de la hoja.
- sp: Espatas.
- St: Estolones.

Figura 1.2.1. Morfología del lirio acuático<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Adaptada de: <http://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=0002102>.

Los pecíolos de esta planta son esponjosos con muchos espacios llenos de aire (aerénquimas) y son los responsables de su flotabilidad (Fig.1.2.2) (Lindsey y Hirt, 2000).

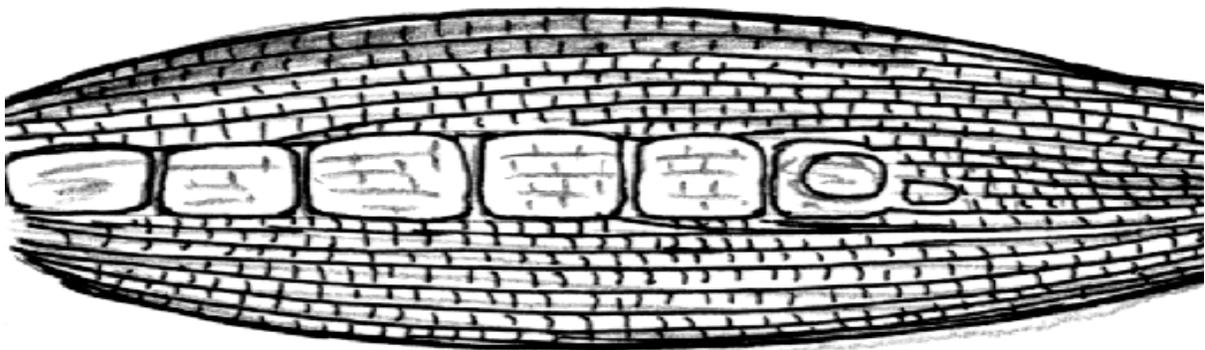


Figura. 1.2.2. Sección transversal de un pecíolo en donde se observan los espacios llenos de aire<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Tomada de: Lindsey y Hirt, 2000

### 1.3. REPRODUCCIÓN

El lirio acuático es capaz de regenerarse prolíficamente vía vegetativa a partir de fragmentos del tallo (brote) y por estolones. Estas dos formas de reproducción (Fig. 1.3.1.) dificultan el control del su crecimiento (*Gunnarsson y Mattsson, 2007*).

Las plantas crecen primero de forma horizontal, hasta que la superficie del cuerpo de agua está prácticamente cubierta y posteriormente comienza el crecimiento vertical, llegándose a encontrar individuos de hasta 1.2m de la inflorescencia a la raíz (*Gakwavu, 2007*).

El tiempo de duplicación de la superficie cubierta por esta vía puede ser de 6 – 18 días en condiciones óptimas de temperatura y humedad, llegándose a alcanzar una tasa de crecimiento de hasta 60 cm/mes y una producción de 140 toneladas de materia seca por hectárea al año (*Malik, 2007*).

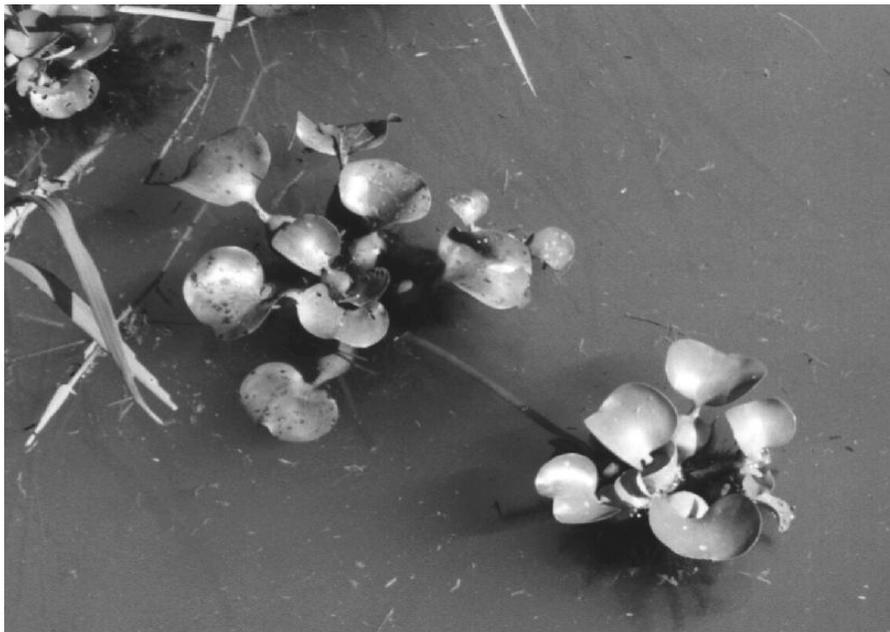


Figura 1.3.1. Reproducción por estolones de *Eichhornia crassipes* vía vegetativa<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Tomada de: Lindsey y Hirt, 2000

También se ha observado que se reproduce sexualmente y sus semillas pueden permanecer viables 15 - 20 años (Fig. 1.3.2). La reproducción por semillas parece ser muy limitada debido a que éstas son sensibles a diversos factores de crecimiento tales como el estrés de oxígeno, luz y temperatura y periodos de inactividad (Malik, 2007).



Figura 1.3.2. Semillas de *Eichhornia crassipes*<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Tomada de: <http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5376438>.

#### 1.4. PROBLEMÁTICA AMBIENTAL, DE SALUD Y ECONÓMICA

La tasa de crecimiento tan alta que presenta el lirio acuático se debe en gran medida a la eutrofización de los cuerpos acuíferos. Adicionalmente, la ausencia de enemigos naturales contribuye a su rápido esparcimiento (Charudattan, 1997).

El lirio acuático está catalogado dentro de las plantas más productivas del mundo y es considerada una de las peores plagas acuáticas. Su densidad de crecimiento interfiere con la navegación, la recreación, la irrigación y la producción de energía. Algunas de las más grandes hidroeléctricas destinan gran cantidad de dinero y horas hombre para remover

completamente esta planta y evitar así que pueda llegar a atascarse en las turbinas y provocar cortes en el suministro de energía. Por ejemplo, en la estación hidroeléctrica "Owen Fall" en Uganda, se ha reportado que los generadores y enfriadores de agua son continuamente dañados por la presencia de matas de lirio, lo que se traduce en la pérdida de gran cantidad de energía eléctrica para en el suministro a las áreas urbanas (Labrada, 1996). Además, el bloqueo de los canales y ríos llega a provocar severas inundaciones (Malik, 2007).

Por otro lado, la presencia del lirio acuático ha ocasionado fuertes impactos económicos a los pescadores debido al decremento en la población de peces, el difícil acceso a ciertas áreas y pérdida y daño al equipo de pesca (Fig. 1.4.1). Cuando un cuerpo de agua está densamente infestado, el consumo de combustible de los barcos de pesca y de transporte, aumenta al doble o al triple, y la captura de peces se ve reducida de un 50 y hasta un 75%, este problema se vuelve muy grave en países que cuentan solo con cuerpos de agua continentales y por lo tanto son la única fuente de pesca y en algunos casos, particularmente en África, puede constituir la única fuente de proteína para consumo humano (Charudattan, 1997; Malik, 2007).

Debido a que esta planta forma matas unidas que flotan, puede llegar a cubrir vastas extensiones de los cuerpos de agua, lo que da como resultado la disminución en la cantidad de luz disponible para la vida subacuática local. El consumo de oxígeno al descomponerse la planta es muy alto lo que provoca escasez de oxígeno para algas y otros organismos que sirven de alimento para los peces (Gunnarsson y Mattsson, 2007). Además, el lirio acuático tiene una fauna asociada que causa un desequilibrio en los micro – ecosistemas (Malik, 2007).

Por último, el incremento en la evaporación debido a la actividad metabólica del lirio puede tener serias implicaciones en aquellos lugares en donde el agua es escasa o secan completamente los cuerpos de agua. En México, la Comisión Federal de Electricidad ha

llevado a cabo estudios de evapotranspiración de los sitios infestados y los ha comparado con los sitios no infestados, obteniéndose como resultado que en algunos lugares, el agua perdida por evapotranspiración es tres veces más a la que evapora un sitio desprovisto de malezas (*Saldaña y Guadiana, 1976*).



Figura 1.4.1. El rápido y congestionado crecimiento del lirio acuático provoca serios problemas<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Tomado de: [http://www.mx.ird.fr/spip.php?page=article\\_programmes\\_regionaux&id\\_article=4821&id\\_rubrique=444](http://www.mx.ird.fr/spip.php?page=article_programmes_regionaux&id_article=4821&id_rubrique=444)

Por sus características, el lirio acuático se ha convertido en un problema en diversas partes del mundo (*Malik, 2007*), empeorando las condiciones de vida de la gente que vive en los alrededores de los cuerpos de agua invadidos, porque las matas que flotan sobre el agua, al ser arrastradas por el viento pueden servir como vectores de transporte de los organismos causantes de enfermedades como la malaria o esquistosomiasis además de volverse sitios de riesgo debido a animales como serpientes y otros venenosos (*Gunnarsson y Mattsson, 2007*). Por lo tanto, se ha vuelto imprescindible hacer investigación enfocada a gestionar de manera sustentable su esparcimiento (*Malik, 2007*).

## 1.5. MÉTODOS DE CONTROL

En el Amazonas, de donde es nativo, el lirio acuático se mantiene bajo control gracias a la acción de los depredadores naturales, así como a las inundaciones anuales, sin embargo, en el resto de los países tropicales no se ha podido encontrar una solución para controlar su crecimiento desmedido (*Lindsey y Hirt, 2000*). En base a esto se ha concluido que es una maleza que no puede erradicarse, sino únicamente controlarse (*Gutiérrez y col. 1997*).

Se han hecho esfuerzos enfocados a controlar la propagación de esta maleza desarrollando métodos físicos, químicos y biológicos (*Malik, 2007*).

Actualmente la cosecha y trituración mecánica del lirio es la principal herramienta para controlar el crecimiento (Fig. 1.5.1), sin embargo, este procedimiento es demasiado caro. En México representa una inyección de recursos por cerca de \$70, 000 por hectárea.



Figura 1.5.1. Cosecha mecánica de lirio acuático<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Tomada de: <http://english.people.com.cn/90783/91300/7459136.html>.

También se pueden llevar a cabo controles biológicos (a través de insectos y peces u otros microorganismos que se alimentan del lirio acuático) y químicos (herbicidas), pero estos métodos pueden estar prohibidos debido al riesgo potencial que implican o ser muy poco exitosos (Malik, 2007).

En la tabla 1.5.1 se resumen los principales métodos de control del crecimiento del lirio y se mencionan sus limitaciones.

**Tabla 1.5.1. Principales métodos de control del crecimiento del lirio acuático<sup>a</sup>.**

Métodos de Control	Agente	Limitaciones
Físicos	Drenaje permanente del área afectada.	No siempre es factible.
	Remoción manual o con redes.	Una labor difícil, cansada y que puede implicar riesgos a las salud.
	Remoción mecánica a través de grúas postradas en tierra, redes de arrastre, o por maquinaria flotante como podadoras, dragas, barcasas o cosechadoras acuáticas.	Alto costo, se requiere de equipo, vehículos y herramientas especializadas para la cosecha y el transporte.
Químicos	Ácido 2,4–diclorofenoxiacético	Caros, no son capaces de controlar infestaciones masivas y a largo plazo provocan efectos secundarios sobre comunidades vecinas y sobre el ambiente.
	Complejo de cobre (2,4 – D)	
	Aspersión de Amina 2,4 – D	
	Sal de endotal potásico.	
	Sal de endotal dimetilalquilamina.	
Biológicos	Glifósfato.	Control insuficiente y regeneración del crecimiento.
	Control clásico por insectos:	
	<i>Neochetina eichhorniae</i> , <i>N. bruchi</i> y <i>Sameodes albiguttalis</i> .	
	Plantas alelopáticas:	
	Polvo de hoja de <i>Coleus amboinicus</i> (40 g/L)	
	<i>Lantana</i>	
	Polvo de <i>Cassytha</i>	
Hongos patógenos:		
<i>Alternaria eichhorniae</i>	Aún se encuentran en etapas de investigación y desarrollo, pueden no ser suficientemente efectivos por si solos y es mejor utilizarlos en combinación con métodos de control mecánico y químico.	

<sup>a</sup> Adaptada de: Malik, 2007.

## 1.6. POSIBLES USOS Y APLICACIONES

A pesar de que el lirio pareciera ser el responsable de todos los problemas mencionados anteriormente, se debe de pensar positivamente en esta planta como una fuente de biomasa y proteína para muchos procesos actuales (*Lindsey y Hirt, 2000 y Malik, 2007*). Se han desarrollado diversos procedimientos para darle un uso práctico a esta maleza y otros siguen aún discutiéndose. Algunos de ellos son:

### 1.6.1. AGENTE DE BIOREMEDIACIÓN

El lirio acuático es una planta que ha llamado la atención por su capacidad de crecer en agua altamente contaminada además de ser capaz de acumular cationes metálicos principalmente en las raíces. Se sabe que las macrófitas acuáticas son capaces de remover iones metálicos por adsorción superficial y/o absorción e incorporación de ellos a sus propios sistemas (principalmente enzimáticos) o almacenamiento en forma ligada.

Se han llevado a cabo investigaciones a nivel piloto para remover materia orgánica y disminuir la demanda bioquímica de oxígeno en aguas residuales domésticas, obteniéndose resultados prometedores. También se ha demostrado la posibilidad de reducir la DBO en aguas residuales de criaderos de cerdos en estanques piloto e industriales en estado continuo. Por último, se ha observado que los lodos de plantas utilizadas para fito-remediación producen significativamente más biogás que el producido por plantas crecidas en aguas limpias. Debido a estas características, uno de los primeros usos que se le dio fue como agente de tratamiento de aguas residuales (Fig. 1.6.1) y ha sido muy efectivo, al grado que se dice que los suelos húmedos que han sido invadidos por el lirio acuático funcionan como riñones naturales (*Malik, 2007; Gakwavu, 2007*).



Figura 1.6.1. Lirio acuático como agente de bioremediación<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Tomada de: *Gakwavu, 2007*.

## 1.6.2. CARBONIZACIÓN

La carbonización es una alternativa que consisten en un proceso de 3 etapas (gasificación, pirólisis y carbonización) del cual es posible obtener carbón que puede ser utilizado como combustible dentro del mismo proceso; sin embargo, se presentan dos problemas en este proceso, el primero es el alto contenido de agua y el segundo es el alto contenido de cenizas (llegando a alcanzar hasta 40% de peso seco) que lo convierten en un combustible de baja calidad (*Malik, 2007*).

## 1.6.3. PRODUCCIÓN DE ETANOL (BIOETANOL)

Debido a que los combustibles fósiles son una fuente de energía no renovable, se han buscado alternativas para encontrar fuentes de energía renovables efectivas, que permitan satisfacer las demandas de combustibles en el futuro. La celulosa y hemicelulosa, (componentes del material lignocelulósico) son considerados como fuertes candidatos para la producción de etanol como combustible. El alto contenido de estos polímeros que se ha reportado en el lirio acuático indica que éstos podrían

ser una buena fuente para la bio-conversión. Debido a su composición, la producción de etanol a partir de él, requiere un proceso de múltiples etapas, entre las cuales se puede incluir la hidrólisis, la fermentación y la destilación. El líquido resultante de la hidrólisis contiene cantidades variables de monosacáridos (pentosas y hexosas) y un amplio rango de otro tipo de sustancias resultantes de la degradación de la lignina o de la reacción de éstas con los azúcares. Por lo anterior, existe el inconveniente de la posible formación de sustancias inhibitorias durante la hidrólisis y que pueden ocasionar efectos negativos en el crecimiento de los microorganismos durante la fermentación. Así que el proceso de fermentación requiere de un microorganismo que sea capaz de fermentar todos los azúcares además de ser resistente a los inhibidores formados (Nigam, 2002).

Por otro lado, el contenido de proteína del lirio es adecuado para actuar como fuente de nitrógeno en cualquier proceso fermentativo. Algunos autores han reportado que la productividad de etanol a partir de lirio acuático es equiparable a la obtenida por la fermentación de bagazo de caña (Nigam, 2002). Sin embargo también se ha encontrado que el balance energético en la producción de etanol a partir de lirio es negativo por lo que se ha recomendado su aplicación solo en casos en los que la demanda de alcohol como combustible sea muy alta (Gunnarsson y Mattsson, 2007; Malik, 2007; Nigam, 2002).

#### 1.6.4. PRODUCCIÓN DE BIOGÁS

El biogás es un combustible formado por la mezcla de metano (50 – 70%), dióxido de carbono, sulfuro de hidrógeno y agua. Esta mezcla gaseosa es formada de manera natural. Se produce espontáneamente en los estómagos de los rumiantes, en el fondo de lagos y pantanos y en los vertederos de basura (Lindsey y Hirt, 2000). La producción de biogás se basa en la digestión anaerobia, proceso a través del cual la materia orgánica es degradada en ausencia de oxígeno. El biogás resultante puede ser usado

para cocinar, calentar, producir energía eléctrica y otros procesos industriales (*Gunnarsson y Mattsson, 2007*).

El gas natural (biogás) es la forma de energía que ha presentado menor impacto ambiental, sobre la salud humana y la contaminación. Esta característica junto con la problemática actual de los combustibles fósiles y otras fuentes de energía hacen que la digestión anaerobia sea un proceso de alto interés para los científicos (*Gunnarsson y Mattsson, 2007*). Se han reportado altos rendimientos de biogás producido a partir de lirio acuático, y rendimientos aún mejor cuando este se mezcla con desechos animales, obteniéndose también un residuo sólido rico en nutrientes que puede ser usado como abono (*Malik, 2007*).

Se han hecho estudios para aumentar la productividad de biogás estimulando la actividad microbiana modificando algunos aditivos químicos y modificando las condiciones de operación, reportándose en algunos casos que lirio con un alto contenido de metales pesados y lirio utilizado para fitoremediación presentan mayor rendimiento en la producción de biogás (*Gunnarsson y Mattsson, 2007*).

Sin embargo existen algunos factores que limitan el aprovechamiento del lirio a través de este proceso. Entre otros, el gran tamaño de los reactores y equipos, una baja eficiencia en la bio-conversión debido a la alta humedad de esta planta y el pretratamiento obligatorio para eliminar aire atrapado en los tejidos del lirio (*Malik, 2007*).

#### 1.6.5. COMPOSTA

Otra alternativa es el composteo, es decir la descomposición aerobia. La composta se puede definir como la descomposición y estabilización biológica de los sustratos orgánicos bajo condiciones que permitan el desarrollo de temperaturas elevadas como

resultado del calor generado biológicamente. El producto final debe ser estable, libre de organismos patógenos, semillas de plantas y benéfico cuando es aplicado en la tierra. Para disminuir la evaporación y pérdida de nitrógeno, en forma de amonio, la composta debe de ser cubierta con paja, pasto o plástico. Es ventajoso usar paja ya que los microorganismos pueden utilizarla como fuente de energía y captar el amonio para satisfacer su demanda de nitrógeno (*Gunnarsson y Mattsson, 2007*).

### **1.7. SITUACIÓN DEL LIRIO ACUÁTICO EN MÉXICO**

Muy poco se conoce acerca de la introducción de esta planta en México. Se cita su presencia desde 1897 como una especie naturalizada y bastante común en las chinampas de Xochimilco. Desde aquella época se vendía en los mercados a través de los canales que comunicaban los lagos del sur de la ciudad (*Gutiérrez y col. 1997*).

En 2000 se calculaba que existía una superficie cubierta por lirio cercana a las 150 000 ha, siendo los estados de Jalisco, Veracruz, Tabasco e Hidalgo los que presentaban el mayor problema con más de 75 000ha (*Gómez-Meléndez y col., 2000*).

Se han registrado problemas por lirio acuático en los estados de Aguascalientes, Baja California Norte, Coahuila, Campeche, Chiapas, Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz (Fig. 1.7.1) (*Gutiérrez y col. 1997; Miranda y Lot, 1999*).

La amplia distribución de esta maleza en el territorio nacional se debe a su gran capacidad de adaptación a gran cantidad de hábitats dulceacuícolas localizados desde el nivel del mar hasta los 2250m de altitud (*Miranda y Lot, 1999*) y al aporte incontrolado de nutrientes provenientes de las aguas residuales de los núcleos

urbanos e industriales agrícolas y a la erosión acelerada de los suelos de las cuencas hidrográficas (Rangel, 1997).

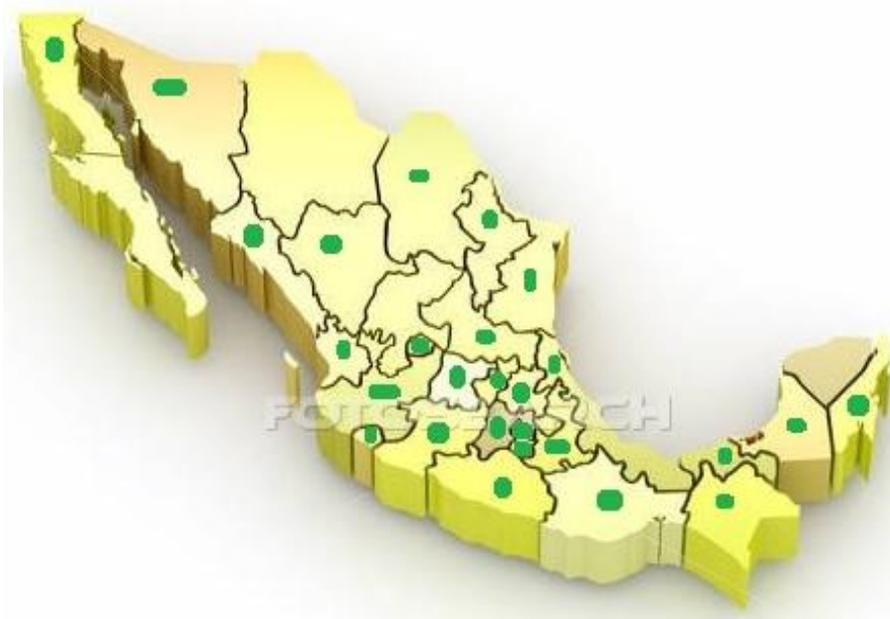


Figura 1.7.1. Estados de la República en donde se ha registrado la presencia de lirio acuático<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Adaptado de: <http://www.fotosearch.com/CSP569/k5695533/>

La biomasa en peso húmedo presente en cuerpos de agua mexicanos generalmente se encuentra entre 11 y 51 Kg/m<sup>2</sup>, correspondientes a 0.62 y 2.87 Kg/m<sup>2</sup> en peso seco. Los tiempos de duplicación de la biomasa tienen una tasa de variación de 7.4 a 46.5 días (Gutiérrez y col. 1997).

Con la finalidad de controlar la invasión de las malezas acuáticas se creó el Programa de Control de Malezas Acuáticas (principalmente lirio y tule) que interfieren con el manejo óptimo de la infraestructura hidráulica nacional y cuerpos de agua como presas, lagos, ríos, canales y drenes.

Con este programa se pretende establecer estrategias de control y de mantenimiento que son procedimientos enfocados a limpiar y evitar la reinfestación con malezas acuáticas (Rangel, 1997).

Debido a los escasos resultados que se obtuvieron con el programa mencionado anteriormente, en 2010 se creó "la Estrategia Nacional sobre especies invasoras en México", la cual propone una visión a mediano plazo (10 años) para consolidar sistemas de prevención, control y erradicación y orientar la participación y el trabajo coordinado de instituciones y sociedad para alcanzar la visión planteada (CANEI, 2010).

En este programa se pretende alcanzar los siguientes objetivos concretos, los cuales serán evaluados el año 2020:

1. Revisar, adecuar y desarrollar el marco legal normativo.
2. Desarrollar capacidades científicas, técnicas, humanas e institucionales.

Con ello se logrará prevenir, detectar y reducir el riesgo de introducción, establecimiento y dispersión de especies invasoras (CANEI, 2010). Por otro lado, se debe de:

3. Establecer la coordinación entre poderes, intergubernamental, interinstitucional y con la sociedad.

Lo que conlleva a establecer programas de control y erradicación de poblaciones de especies invasoras que minimicen o eliminen sus impactos negativos y favorezcan la restauración y conservación de los ecosistemas (CANEI, 2010), y con ello:

4. Impulsar la divulgación, educación y la concientización de la sociedad en general.
5. Generar conocimiento para la toma de decisiones informadas.

Y así, informar oportuna y eficazmente a la sociedad para que asuma responsablemente las acciones a su alcance en la prevención, control y erradicación de las especies invasoras (CANEI, 2010).

## 1.8. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL LIRIO ACUÁTICO

Una revisión bibliográfica de publicaciones de los últimos 30 años sobre la composición química del lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) nos permitió construir la tabla 1.8.1. Lo que resalta es la variabilidad de la composición química del lirio acuático según la muestra de la planta analizada. Esta variabilidad depende también de la edad de las plantas nunca definidas en las publicaciones y de las técnicas analíticas usadas que nunca han sido las mismas.

**Tabla 1.8.1. Composición química de lirio acuático.**

Referencia	Muestra	C (%)	H (%)	L (%)	C+H+L (%)	A (%)	E (%)
<i>Wolverton y McDonald, 1981</i>	P. C.	21.5	<b>33.9</b>	6.0	<b>61.4</b>	11.1	27.5
<i>Patel y col., 1993</i>	P. C.	17.8	<b>43.4</b>	7.8	<b>69.0</b>	20.2	10.8
<i>Mishima y col., 2006</i>	P. C.	21.1	<b>25.9</b>	12	<b>59.0</b>	16.3	24.7
<i>Nigam, 2002</i>	P. C.	18.2	<b>48.7</b>	3.5	<b>70.4</b>	-	-
<i>Bolenz y col., 1990</i>	T. y H.	<b>31</b>	22	7	<b>60.0</b>	15	25.0
<i>Goswani y Saikia, 1994</i>	T. y H.	<b>32</b>	21	6.7	<b>59.7</b>	18.4	15.7
<i>Abraham y Kurup, 1997</i>	T. y H.	<b>35</b>	18.3	4.6	<b>58.0</b>	15.1	27.0
<i>Kivaisi y Mtila, 1998</i>	T. y H.	<b>25.2</b>	23.1	9.7	<b>58.0</b>	-	-
<i>Tan y col., 2008</i>	T. y H.	<b>27.4</b>	27.4	11.5	<b>66.3</b>	12.7	21
<i>Lindsey y Hirt, 2000</i>	T. y H.	<b>32.0</b>	21	14	<b>67</b>	19.9	4.72
<i>Bhattacharya y col., 2010</i>	T. y H.	<b>25</b>	35	10	<b>70</b>	20	-
<i>Chanakya y col., 1993</i>	H	18	<b>34.0</b>	26.3	<b>78.3</b>	-	21.7
<i>Mishima y col., 2006</i>	H	18.1	<b>25.0</b>	13.3	<b>56.4</b>	16.5	27.1
<i>Girisuta, 2008</i>	H	46.7	-	27.7	<b>74.4</b>	18.2	7.4
<i>Mishima y col., 2008</i>	H	19.7	<b>27.1</b>	-	-	-	-

C = Celulosa; H = Hemicelulosa; L = Lignina; A = Cenizas y E = Extractivos.

C + H + L = Sumatoria del contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina.

P. C. = Planta Completa; T y H = Tallo y hoja; H = Hoja.

Los datos reportados en la literatura en los últimos 30 años para la composición del lirio acuático reflejan una gran variación en el contenido de su material lignocelulósico. En general, se reporta que la hemicelulosa es el polímero mayoritario, encontrando alrededor de  $28.0 \pm 9.5\%$  (base seca [bs]) de hemicelulosa, seguido por la celulosa ( $25.0 \pm 6.2\%$  bs) y la lignina ( $11.5 \pm 7.4\%$  bs). Los datos reportados muestran la presencia de una fracción importante de material extraíble en fases acuosa y etanólica ( $20.0 \pm 6.6\%$  bs). La gran variabilidad en los resultados reportados se debe a: a) el uso de diferentes métodos de análisis, b) la ubicación del cuerpo de agua y la época del muestreo, c) la parte analizada de la planta, y d) la edad de la planta (grado de madurez). En particular, la edad de la planta es una característica escasamente reportada, no obstante, es determinante para la proporción de raíces, tallos y hojas en la planta, así como para la distribución de material lignocelulósico (lignina, hemicelulosa y celulosa) en cada una de ellas.

## 2. ANTECEDENTES

*Lindsey y Hirt* en el año 2000, plantean una cuestión interesante en el libro "¡Usos del lirio acuático! Un manual práctico para usos del lirio acuático alrededor del mundo", ¿Debemos ver al lirio acuático solo como una hermosa maleza nociva o como una potencial fuente de biomasa? Y la respuesta parece estar encaminada a que no solo podemos, sino que debemos obtener una ventaja a partir de él.

Se han hecho investigaciones muy importantes con la finalidad de obtener conocimientos que permitan establecer procesos, mecanismos y tecnología para aprovechar al máximo el potencial de biomasa de esta planta. Como ejemplo claro tenemos los siguientes trabajos:

### 2.1. ***"Thermochemical pretreatment of water hyacinth for improved biomethanation."***

Este trabajo fue llevado a cabo en el Departamento de Posgraduados en Biociencias de la Universidad Sardar Patel en Vallabh Vidyanagar, Gujarat, en la India por los investigadores Vikram Patel, Manik Desai y Datta Madamwar y publicado en 1993 en la revista "*Applied Biochemistry and Biotechnology*".

En este estudio se describe como el lirio acuático fue sometido a una serie de pre-tratamientos termoquímicos y usado como sustrato en digestores anaeróbicos para la generación de metano. Los pretratamientos fueron llevados a cabo a diferentes temperaturas, a 50, 100 y 121°C (con vapor) para cada pH. Los valores de pH ensayados en este estudio fueron 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13. Los valores de pH se ajustaron adicionando la cantidad necesaria ya sea de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. Todos los pretratamientos tuvieron una duración de 1h. Después del pretratamiento, las muestras se filtraron y neutralizaron a pH 7 y se introdujeron en el digestor a 37°C, con agitación intermitente en régimen semicontinuo. La biodegradabilidad del lirio se midió en términos de su producción de gas y de su contenido de metano. Los resultados indican que el pre-

tratamiento seleccionado incrementa la solubilidad de la biomasa y mejora la productividad de biogás. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando pH 11.0 y una temperatura de 121°C. Diversas combinaciones en las condiciones tratamiento mostraron efectos negativos, principalmente sobre bacterias metanogénicas debido a la formación de compuestos tóxicos generados durante el tratamiento (Patel y col., 1993).

## **2.2. "Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast".**

Este trabajo fue realizado por el investigador J. N. Nigam en la División de Bioquímica del Laboratorio de Investigación Regional en Jorhat, Assam, la India. Fue publicado en la revista "*Journal of Biotechnology*" en 2002.

En este trabajo se utilizó el hidrolizado de hemicelulosa como sustrato para la producción de etanol usando *Pichia stipitis* NR RL Y-7124. El hidrolizado se preparó a partir de lirio seco y molido sometiéndolo a reflujo por 7h con una solución de ácido sulfúrico al 1%. El residuo no hidrolizado se lavó con agua caliente. Posteriormente, el hidrolizado se calentó a 100°C por 15 minutos para remover los compuestos tóxicos volátiles. Se ajustó el pH a 10 con hidróxido de calcio y sulfito de sodio, se filtró para remover sólidos insolubles con lo que se logró mejorar los rendimientos en la producción de etanol. La cantidad de azúcares utilizados y el rendimiento de etanol ( $Y_{p/s}$ ) con el hidrolizado no tratado fueron de 20.15% y 0.19 g<sub>p</sub> g<sub>s</sub><sup>-1</sup>, respectivamente, comparados con un 76% y 0.35 g<sub>p</sub> g<sub>s</sub><sup>-1</sup> respectivamente para el hidrolizado tratado. La fermentación resultó ser muy exitosa con una aireación de 0.02 v/v/m, a 30°C y pH 6. Sin embargo, la productividad volumétrica ( $Q_p$ ) sigue estando por debajo de la observada en un medio con una composición de azúcares similar al hidrolizado ácido de hemicelulosa. No hubo fermentación de la arabinosa; sin embargo, ésta si fue asimilada. La presencia de ácido acético redujo considerablemente el rendimiento y la productividad (Nigam, 2002).

**2.3. "Appropriate technology for bioconversion of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) to liquid ethanol: Future prospects for community strengthening and sustainable development".**

En el año 2007, los investigadores Chartchalerm Isarankura-Na-Ayudhya, Tanawut Tantimongcolwat, Thikamporn Kongpanpee, Ponpitak Prabkate y Virapong Prachayasittikul del Departamento de Microbiología Clínica de la Facultad de Tecnología Médica de la Universidad Mahidol en Bangkok, Tailandia, presentaron su trabajo en la revista "EXCLI Journal".

En este estudio se evaluó la necesidad de generar la tecnología apropiada para mejorar la producción de energía renovable. Usando dos etapas consecutivas de hidrólisis (ácido sulfúrico 10%) y fermentación (*Candida shehatae* TISTR 5843) se encontró un proceso de bioconversión de xilosa a etanol exitoso. El proceso de hidrólisis comenzó con una primera etapa en la que el lirio seco y molido fue mezclado con una solución de ácido sulfúrico al 10% y sometido a un proceso en autoclave a 121°C por 15 minutos. El filtrado fue recuperado y se analizó el contenido de xilosa. Este hidrolizado fue desintoxicado calentándolo a 60°C y alcalinizado a pH 9 con hidróxido de sodio sólido y ajustado a pH 10 con hidróxido de calcio. Se filtró para remover los sólidos insolubles y el sobrenadante se colectó para ser usado como medio de cultivo. Para ello se adicionó neopeptona y se ajustó el pH a 5.6. Esta solución se diluyó y esterilizó a 121°C, 15lbs, 15min. Se inoculó con *C. shehatae* y se incubó a 30°C por 3 semanas. La técnica desarrollada nos permite encontrar un proceso de bajo costo para aprovechar el lirio acuático como materia prima. También se desarrollaron las técnicas apropiadas para la cuantificación de xilosa y etanol usando ensayos con floroglucinol y dicromato de potasio respectivamente conjuntamente con un fotómetro portátil de construcción propia. La tecnología que se desarrolló se pretende implementarla en países del tercer mundo para mitigar su dependencia tecnológica (Isarankura-Na-Ayudhya y col., 2007).

#### **2.4. "Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth".**

Trabajo llevado a cabo en el Laboratorio de Biofísica Molecular del Colegio de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Ciencia y Tecnología Huazhong en Wuhan, República Popular China, por el grupo de investigadores Fuying Ma, Na Yang, Chunyan Xu, Hongbo Yu, Jianguo Wu y Xiaoyu Zhang, y publicado en la revista "*Bioresource Technology*" en el año 2010.

Se evaluó el pretratamiento suave con ácido combinado con el pretratamiento con hongos de los géneros *Echinodontium taxodii* o *Antrrodia sp.* 5898 bajo diferentes condiciones para la hidrólisis enzimática y la producción de etanol a partir del lirio acuático. Los tratamientos con *Antrrodia sp* tuvieron menores rendimiento debido a la liberación de material lignina, mientras que el proceso que combinó el pretratamiento con *E. taxodii* (10 días) y el pretratamiento con una solución de ácido sulfúrico al 0.25% y 100°C por 1h fue la que arrojó los mejores resultados. El rendimiento en el consumo de azúcares de la hidrólisis enzimática co-tratada con ácido incrementó 1.13 - 2.11 veces que la encontrada solo con el tratamiento ácido bajo las mismas condiciones. Posteriormente se evaluó por separado la hidrólisis y la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* encontrándose que el rendimiento en la producción de etanol con el co-tratamiento ácido enzimático alcanzó 0.192g g<sup>-1</sup> de materia seca, el cual fue superior al encontrado con el tratamiento ácido (0.146g g<sup>-1</sup> de materia seca). Los resultados obtenidos sugieren que la combinación del pretratamiento suave con ácido y biológico es un método factible para mejorar la hidrólisis enzimática y la producción de etanol a partir del lirio acuático con bajo contenido de lignina (Ma, y col., 2010).

Estos estudios son una pequeña muestra del interés que existe actualmente por desarrollar tecnología y conocimientos que nos permitan aprovechar de manera sustentable la biomasa del lirio acuático.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) es considerada maleza nociva que ha atraído la atención del mundo debido a su rápida propagación y crecimiento congestionado, lo cual ha conducido a problemas serios en la navegación, irrigación, y reducción de la fauna nativa de ríos, lagos y lagunas en zonas tropicales. Los intentos por controlar el crecimiento de ésta maleza han tenido un costo alto y solo han sido soluciones temporales.

Por otro lado, cuando se ve el problema desde el enfoque de investigación éste parece ser una fuente invaluable de recursos con propiedades únicas. Debido a su rápido crecimiento, a su composición rica en polisacáridos y a su capacidad de remover contaminantes de los cuerpos acuíferos, el lirio acuático, también puede ser considerado como una materia prima potencial para la industria de biocombustibles (bio – etanol), de alimentos funcionales, bioremediación, entre otras. Como resultado, las investigaciones enfocadas al control (especialmente al control biológico) y utilización (especialmente tratamiento de aguas residuales o fitoremediación) del lirio acuático han ido en auge durante las últimas décadas. Las investigaciones sobre la producción de biogás y compostas a partir del lirio acuático también han venido en auge, principalmente por grupos de investigación en la India y actualmente en México.

Es por esto que en este trabajo tratamos de caracterizar la composición química del lirio acuático para poder establecer estrategias que nos permitan encontrar usos y aplicaciones de esta planta y así contribuir en el control de la plaga y convertirlo en una fuente de productos con alto valor agregado.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el cambio de la composición del lirio acuático en función de su grado de madurez y de un tratamiento biotecnológico con hongos filamentosos, así como la obtención de las fracciones A y B de la hemicelulosa a partir de los polisacáridos estructurales de este.

### **4.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- ⊖ Determinar la composición de tallo y hojas de lirio acuático con diferentes grados de madurez.
  
- ⊖ Separar, obtener y purificar las fracciones A y B de hemicelulosa para la evaluación de su posible uso como fibra alimentaria.
  
- ⊖ Determinar el efecto del crecimiento de hongos filamentosos en la composición del lirio acuático.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. MATERIA PRIMA

- ⊖ Lirio acuático de la empresa TEMA (Tecnología Especializada en Medio Ambiente) molido e irradiado (L-**111109**; radiación gamma con dosis máxima de 10 KGy).
  
- ⊖ Hojas de Lirio acuático recolectado en Xochimilco, México D.F. en el mes de Octubre de 2010 y deshidratado en un secador de charolas a 60°C en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (L-**281010**).
  
- ⊖ Tallo de Lirio acuático recolectado en Xochimilco, México D.F. en el mes de Febrero de 2011 y deshidratado en un secador de charolas a 60°C en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (L-**020211**).
  
- ⊖ Hoja y Tallo de Lirio acuático recolectado en Xochimilco, México D.F. en los meses de Abril y Julio de 2011 y deshidratados en un secador de charolas a 60°C en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (L-**040411** y L-**130711**).

### 5.2. MATERIALES Y EQUIPO

- ⊖ Molino para granos.
- ⊖ Termobalanza (OHAUS MB45).
- ⊖ Balanza analítica (OHAUS Analytical *Plus*).
- ⊖ Columnas Soxhlet (Pyrex y Kimax) con adaptador a refrigerante.
- ⊖ Cartuchos de celulosa de pared simple (Whatman).
- ⊖ Mantillas de calentamiento y combo de termostatos (Glas-Col).
- ⊖ Refrigerador recirculador (SEV FC 6X2).

- ⊖ Juego de micropipetas (Biohit Proline Plus).
- ⊖ Espectrofotómetro UV-Visible (Shimadzu UV-1800).
- ⊖ Celdas para espectrofotómetro UV y visible (PLASTIBRAND).
- ⊖ Agitador giratorio (Orbit Lab line).
- ⊖ Autoclave eléctrica (120 °C y 15psias).
- ⊖ HPLC (Bomba binaria Perkin Elmer LC PUMP 250, detector de índice de refracción Perkin Elmer LC – 30 RI, horno calentador Eppendorf TC – 50, columna BIORRAD para análisis de ácidos orgánicos e integrador Perkin Elmer NCI 900. Software Perkin Elmer TotalChrom Workstation Versión 6.3.2.).
- ⊖ Microcentrífuga (Eppendorf 5418).
- ⊖ Membranas de 0.22 μm (Millipore).
- ⊖ Filtros de 0.22 μm (Nylon Titan 2).
- ⊖ Sonicador (Cole Parmer 8893).
- ⊖ Centrífuga refrigerada (Beckman Coulter Allegra 25R).
- ⊖ Potenciómetro (Conductronic pH 120).
- ⊖ Estufas 65 y 85 °C (Felisa).
- ⊖ Bomba de vacío.
- ⊖ Papel filtro libre de cenizas (Whatman 541).
- ⊖ Matraces volumétricos de 50, 100 y 1000mL (Pyrex).
- ⊖ Frascos de vidrio de 500mL con tapa hermética.
- ⊖ Matraces balón de 250mL (Pyrex con boca esmerilada 24/40).
- ⊖ Matraces Erlenmeyer 50mL (Pyrex y Kimax).
- ⊖ Vasos de precipitados de 50, 100 y 250mL (Pyrex, Kimax y Nalgene).
- ⊖ Botes y tubos para centrífuga (Nalgene y Corning).
- ⊖ Agitador magnético.
- ⊖ Sistema de secado por frío (LABCONCO Lyph-Lock 6).
- ⊖ Mufla (Thermolyne 1400).
- ⊖ Crisoles de porcelana (Corning).
- ⊖ Material propio de laboratorio.

### 5.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

- ⊖ Humedad (*Sluiter y col., 2008*)
- ⊖ Sólidos totales (*Sluiter y col., 2008*)
- ⊖ Extractivos (*Sluiter y col., 2005b*)
- ⊖ Azúcares reductores (*Miller, 1959*)
- ⊖ Azúcares totales (*Dubois y col., 1956*)
- ⊖ Termoquímico (*Modificación de Kálmán y col., 2002; Ramos, 2003; Nabarlatz y col., 2004*).
- ⊖ Determinación de lignina Klason, monómeros, xilanos e inhibidores (*Modificación de Kálmán y col., 2002; Ramos, 2003; Nabarlatz y col., 2004*)
- ⊖ Alcalino – peróxido (*Modificación de Kálmán y col., 2002; Ramos, 2003; Nabarlatz y col., 2004*).
- ⊖ Cenizas (*Sluiter y col., 2005a*).
- ⊖ Determinación de lignina, hemicelulosa y celulosa (*Modificación de Kálmán y col., 2002; Ramos, 2003; Nabarlatz y col., 2004*).
- ⊖ Extracción y purificación de las fracciones A y B de hemicelulosa (*Du Toit y col., 1984*).

### 5.4. REACTIVOS

- ⊖ Alcohol etílico absoluto 99.6% (*J.T. Baker*)
- ⊖ Ácido 3 – 5 – Dinitrosalicílico (*Sigma*)
- ⊖ Ácido sulfúrico 99.9% (*J.T. Baker*)
- ⊖ Dextrosa, Xilosa, Arabinosa y Lignina alcalina (*Sigma*)
- ⊖ Ácido acético (*J.T. Baker*)

## 6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

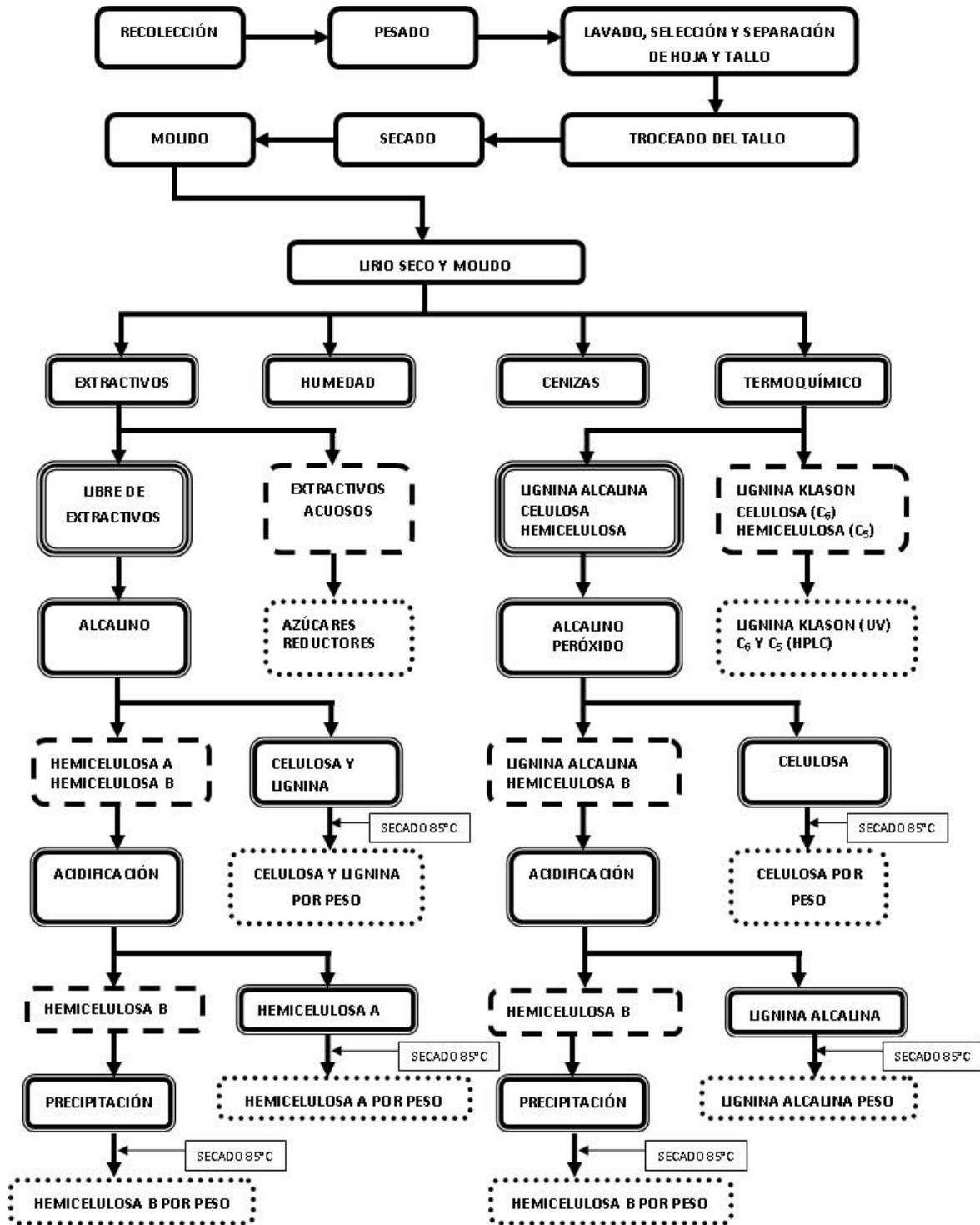


Figura 6.1. Diagrama de flujo para llevar a cabo el análisis del lirio acuático.

En la figura 6.1 se describe de manera esquemática la estrategia utilizada para llevar a cabo los análisis para caracterizar el lirio acuático.

Se analizaron diferentes lotes de lirio recolectados en diferentes épocas del año, asignándoseles la fecha del día de recolección como lote. Dependiendo de su grado de madurez se les denominó de la siguiente manera:

- ✓ Tallo y hoja joven (L-**040411**): Corresponde a lirio acuático de tallo pequeño de entre 30 y 35cm de longitud, hojas de color verde claro pequeñas de aproximadamente 5 – 6cm de longitud en su parte más extensa 4 meses de edad (Fig. 6.2).
- ✓ Tallo y hoja mediana (L-**130711**): Corresponde a lirio acuático de tallo grueso y más largo que el anterior de alrededor de 40 – 45cm de longitud, hojas de color verde intenso pequeñas de entre 8 – 10cm de longitud en su parte más extensa y aproximadamente 7 meses de edad (Fig. 6.2).
- ✓ Tallo y hoja maduros (L-**020211 y L-281010**): Corresponde a lirio acuático de tallo delgado y largo de alrededor de 60 – 70cm de longitud con hojas de color verde intenso grandes de entre 12 – 15cm de longitud en su parte más extensa y aproximadamente 11 meses de edad.

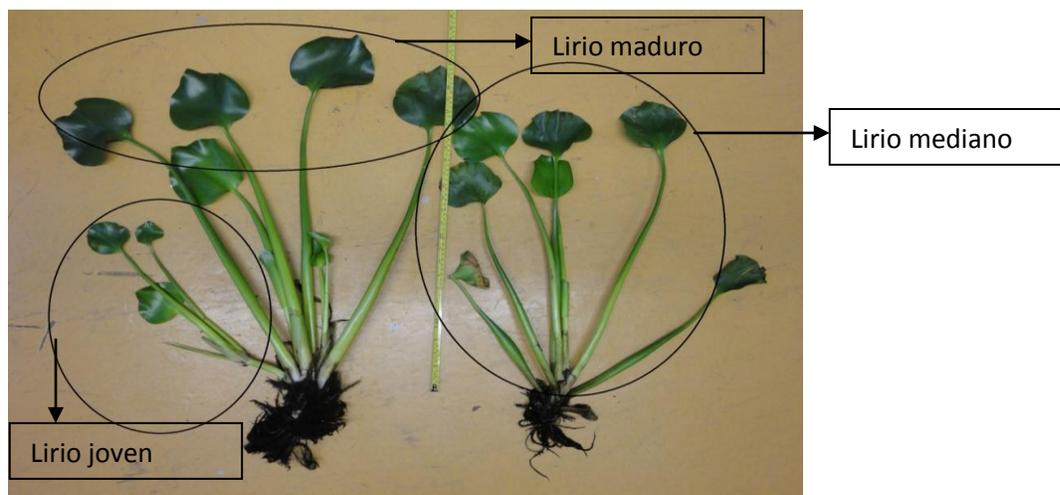


Figura 6.2. Lirio acuático de diferentes grados de madurez (joven, mediano y maduro).

Lirio TEMA (L-**111109**): Mezcla de las fracciones hoja y tallo, recolectado por la empresa "Tecnología Especializada en Medio Ambiente (TEMA)" y corresponde a lirio acuático de aproximadamente 11 meses de edad.

#### ⊖ COLECTA

El proceso para caracterizar el lirio acuático comenzó con la colecta en los canales de Xochimilco, en la ciudad de México, en diferentes fechas, octubre de 2010, febrero, abril y julio de 2011. Posteriormente, cada lote de material se trasladó a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) para su acondicionamiento.

#### ⊖ ACONDICIONAMIENTO

Una vez en la ENCB el lirio acuático se pesó para hacer los balances de materia necesarios, se seleccionó el material en buenas condiciones (no podrido y/o infestado con gusanos o insectos), se limpió y se separó la hoja del tallo. Los tallos se cortaron en trozos de 2cm aproximadamente. Se deshidrataron ambas fracciones (tallo y hoja) en un secador de charolas a 60°C por aproximadamente 24h, momento en el cual la humedad final del material estuvo por debajo del 13%. El producto deshidratado se empacó en bolsas de polipropileno con aproximadamente 0.5Kg y se sellaron para evitar que el material volviera a absorber humedad del ambiente o se contaminara con microorganismos. Este material se llevó a la planta piloto 4 de la Universidad Autónoma Metropolitana campus Iztapalapa, en donde se llevaron a cabo los análisis fisicoquímicos.

Estos procedimientos solo se llevaron a cabo para el lirio acuático recolectado en Xochimilco. El lirio del lote **111109** fue proporcionado por la empresa Tecnología Especializada en Medio Ambiente y fue tratado con radiación gamma (10 Kgy máximo) para disminuir su carga microbiana.

## ⊖ DETERMINACIÓN DE HUMEDAD Y SÓLIDOS TOTALES

Primero, el lirio fue molido (Fig. 6.2) con un molino de granos para reducir el tamaño de partícula ya que este material es muy poco denso y por lo tanto ocupa mucho espacio. Posteriormente, se midió inmediatamente la humedad con la ayuda de una termobalanza calibrando el programa a 100°C (véase el anexo III). Los sólidos totales se calcularon por diferencia (*Sluiter y col., 2008*).



Figura 6.2. Hoja y tallo (de izquierda a derecha) de lirio acuático secado a 60°C molido.

## ⊖ CENIZAS

Se colocó una muestra de lirio acuático molido en un crisol de porcelana previamente tarado y se introdujo en una mufla a 525 °C durante 4h. Transcurrido este tiempo, se sacó el crisol de la mufla y se dejó enfriar en un desecador de vidrio durante 1.5h y se pesó para calcular el contenido de cenizas de la muestra (Véase anexo III) (*Sluiter y col., 2005a*).

## ⊖ EXTRACTIVOS, AZÚCARES REDUCTORES Y TOTALES

Se empacó una cantidad conocida de materia molida en un cartucho de celulosa seco y tarado que fue sometido a un proceso de extracción con agua y etanol por 8 y 4h respectivamente (*Sluiter y col., 2005b*) (Fig. 6.3). Una vez terminada la extracción se recuperó el cartucho con la materia libre de extractivos, se puso a secar a 65°C por 24h y se pesó para calcular el contenido de "extractivos totales". Por otro lado, se recuperó el extracto acuoso, se midió el volumen y se determinó el contenido de azúcares totales y azúcares reductores (Véase anexo III) (*Miller, 1959; Dubois y col., 1956*).



Figura 6.3. Método de Soxhlet para determinación de extractivos.

## ⊖ TRATAMIENTO TERMOQUÍMICO Y ALCALINO – PERÓXIDO.

Por otro lado, una muestra de 5g se colocó en un frasco de vidrio con tapa hermética y se le adicionaron 95mL de una solución de ácido sulfúrico al 1.5% v/v. El frasco se mantuvo en agitación a 150rpm por 24h y una vez transcurrido este tiempo se sometió al tratamiento termoquímico, el cual consistió en un calentamiento en autoclave a 120 °C y 15 lbs/in<sup>2</sup> durante 30 minutos y una despresurización violenta (disminución de la presión de operación a presión atmosférica en menos de un minuto). Una vez frío, el material se filtró a través de papel filtro Whatman No. 541 libre de cenizas seco y previamente tarado. Se recuperó el líquido filtrado, se midió su volumen y se tomaron dos muestras; una se utilizó para leer absorbancia en un espectrofotómetro a 280nm (haciendo las diluciones pertinentes) para determinar el contenido de lignina Klason y la otra se centrifugó en una microcentrífuga, se recuperó el sobrenadante, se filtró a través de una membrana de 0.22µm y se inyectó en un equipo de HPLC (Fig. 6.4) para cuantificar monómeros (glucosa, xilosa y arabinosa), ácido acético, furfural y 5-hidróximetilfurfural (5-HMF). El residuo sólido se puso a secar junto con el papel filtro a 100 °C durante 12h. Se pesó y se recuperó la materia no degradada (*Modificación de Kálmán y col., 2002; Ramos, 2003; Nabarlatz y col., 2004*).

La materia no degradada en el tratamiento termoquímico se sometió al tratamiento alcalino – peróxido para lo cual se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 50mL y se le adicionaron 15mL de una solución al 2.25%w/v de hidróxido de sodio y 0.75v/v de peróxido de hidrógeno. Se mantuvo en agitación a 150rpm a 55 °C durante una hora. Se filtró a través de papel filtro seco y tarado. Se recuperó el residuo sólido y se puso a secar a 100°C por 24h y se pesó, también se recuperó el líquido filtrado, se acidificó con una solución de ácido acético al 50%v/v hasta pH 4.5, agitándose constantemente durante 10 minutos hasta que se estabilizó el precipitado formado; se centrifugó a 5000rpm durante 20 minutos y 15°C, se recuperó el residuo sólido que representa la fracción de lignina

soluble en álcali, se puso a secar a 100°C y se pesó (*Modificación de Kálmán y col., 2002; Ramos, 2003; Nabarlatz y col., 2004*).



Figura 6.4. Equipo HPLC utilizado para determinar monómeros (C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>) e inhibidores.

El filtrado líquido obtenido del procedimiento anterior, fue tratado con alcohol etílico absoluto en proporción de 3 volúmenes por cada volumen de filtrado, adicionando este gota a gota y en agitación constante para que se forme un precipitado que representa la fracción B de la hemicelulosa. Se dejó en refrigeración por 12h, se centrifugó a 5000rpm durante 20 minutos y 15°C. El sobrenadante se desechó y el residuo sólido se seco a 65°C por 24h y se pesó (Véase anexo III) (*Modificación de Kálmán y col., 2002; Ramos, 2003; Nabarlatz y col., 2004*).

Con los datos obtenidos se hizo el cálculo del contenido total de celulosa, hemicelulosa y lignina. Todos los análisis se hicieron por triplicado (Véase anexo III).

## ⊖ TRATAMIENTO ALCALINO (SEPARACIÓN DE HEMICELULOSA A Y B)

También se llevó a cabo un procedimiento preparativo de materia libre de extractivos, para someterla a un tratamiento alcalino para separar las fracciones A y B de hemicelulosa. Para ello, una cantidad conocida de lirio seco y molido se empacó en varios cartuchos de celulosa y se procedió a una extracción con agua y alcohol bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Una vez obtenida la materia libre de extractivos se transfirió a un matraz Erlenmeyer de capacidad adecuada y se adicionaron 15mL de una solución de hidróxido de sodio al 4%w/v por cada gramo de materia libre de extractivos. Se mantuvo en agitación durante 24h. Se filtró a través de papel filtro seco y tarado (*Du Toit y col., 1984*).

El residuo sólido se desechó. El líquido filtrado se acidificó con una solución de ácido acético al 50%v/v hasta pH 4.5 y se mantuvo en agitación durante 10 minutos para estabilizar el precipitado que se formó (Hemicelulosa A), se centrifugó a 5000rpm durante 20 minutos y 15°C. El residuo sólido se liofilizó y se pesó.

Por otro lado, el sobrenadante se trató con alcohol etílico absoluto en proporción de 3 volúmenes de alcohol por cada volumen de filtrado, agregando éste gota a gota y en agitación constante para formar un precipitado que representa la fracción B de Hemicelulosa. El sobrenadante líquido se desechó y el residuo sólido se liofilizó y se pesó (Véase anexo III) (*Du Toit y col., 1984*).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DEBIDOS AL GRADO DE MADUREZ

#### ⊖ HUMEDAD

Se midió el contenido de humedad (*Sluiter y col., 2008*) en tallo y hoja secos de los diferentes lotes y en el lirio TEMA irradiado. Con esto se calculó el contenido de sólidos totales (*Sluiter y col., 2008*) y se hizo el cálculo en base seca (gramos de compuesto por cada 100 gramos de materia seca). Los resultados se muestran en la tabla 7.1.1.

**Tabla 7.1.1. Resultados del análisis de humedad.**

Lote	Humedad (%)
<b>TEMA</b>	
Maduro (L-111109)	9.33 ± 0.20
<b>TALLO</b>	
Joven (L-040411)	9.84 ± 0.40
Mediano (L-130711)	8.89 ± 0.20
Maduro (L-020211)	3.78 ± 0.16
<b>HOJA</b>	
Joven (L-040411)	8.84 ± 0.22
Mediano (L-130711)	7.98 ± 0.18
Maduro (L-281010)	4.12 ± 0.23

± Desviación estándar de los triplicados.

El lirio fresco, presentó una humedad promedio mayor al 90%, y se sometió al proceso de secado a 60°C como método de conservación (*Juárez, 2010*). Con este método se obtuvo en todos los casos un valor de humedad por debajo del 13%, que es el mínimo permitido para evitar la proliferación microbiana en un producto deshidratado de este tipo (*Guzmán*

y col., 2006) ya que con este valor se alcanza una actividad de agua menor o igual a 0.6 que es el recomendado por la FAO para detener el crecimiento de cualquier tipo de microorganismo incluidos los xerófitos (Alzamora y col., 2004). Esto nos permite saber que no tenemos interferencia por degradación microbiana del material lignocelulósico de nuestra materia prima, que finalmente es el que nos interesa medir.

## ⊖ SÓLIDOS TOTALES

Por otra parte, el contenido de sólidos totales se calculó por diferencia (Sluiter y col., 2008), entre la materia húmeda considerada como el 100% menos el contenido de humedad, registrándose los resultados que se muestran en la tabla 7.1.2.

**Tabla 7.1.2. Resultados para el cálculo de sólidos totales.**

Lote	Sólidos totales (%)
<b>TEMA</b>	
Maduro (L-111109)	90.67 ± 0.20
<b>TALLO</b>	
Joven (L-040411)	90.16 ± 0.40
Mediano (L-130711)	91.11 ± 0.20
Maduro (L-020211)	96.22 ± 0.16
<b>HOJA</b>	
Joven (L-040411)	91.16 ± 0.22
Mediano (L-130711)	92.02 ± 0.18
Maduro (L-281010)	95.88 ± 0.23

± Desviación estándar de los triplicados.

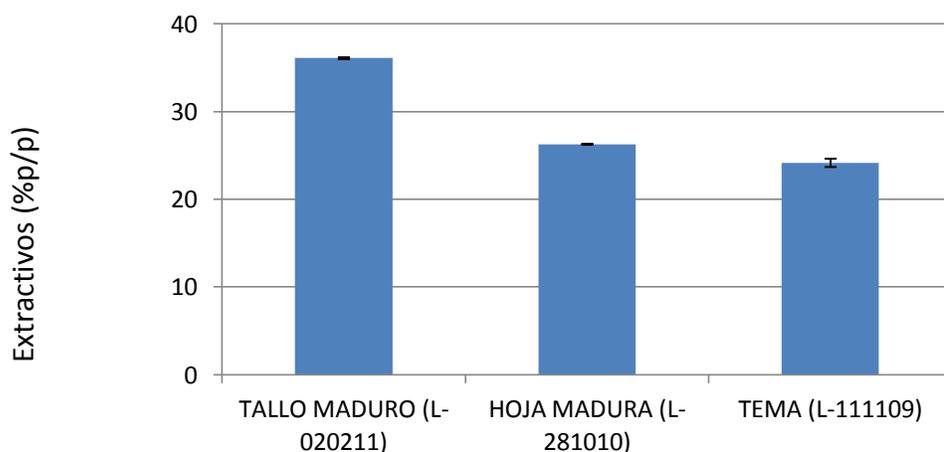
Con el cálculo del contenido de sólidos totales para ambas fracciones (tallo y hoja) y para el lirio TEMA irradiado fue posible hacer los cálculos de composición en base seca. Esto se hizo con la finalidad de tener un parámetro de referencia mejor establecido ya que el lirio

seco absorbe demasiada humedad en cuanto entra en contacto con el ambiente lo que nos podría dar resultados erróneos debidos a este fenómeno (Sluiter y col., 2008). Los resultados obtenidos nos indican que de cada 100g de materia inicial, aproximadamente 90g contienen los compuestos de nuestro interés.

## ⊖ EXTRACTIVOS

Los extractivos son definidos como aquellas sustancias que son solubles en agua y solubles en etanol en sus puntos de ebullición (para este trabajo). Los extractivos acuosos incluyen principalmente los compuestos inorgánicos, azúcares no estructurales, sustancias nitrogenadas entre otros, mientras que los extractivos solubles en etanol comprenden clorofila, ceras y otros componentes menores como xantofilas (Sluiter y col., 2005b). Estos fueron calculados por el método de Soxhlet (Sluiter y col., 2005b) obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 7.1.3 (Véase el Anexo I).

El contenido de extractivos siempre es mayor en tallo que en hoja y lirio TEMA irradiado, siendo su contenido promedio de 36, 26 y 24 ( $g_{\text{extractivos}}/100g_{\text{Ms}}$ ) respectivamente (Gráf. 7.1.1).



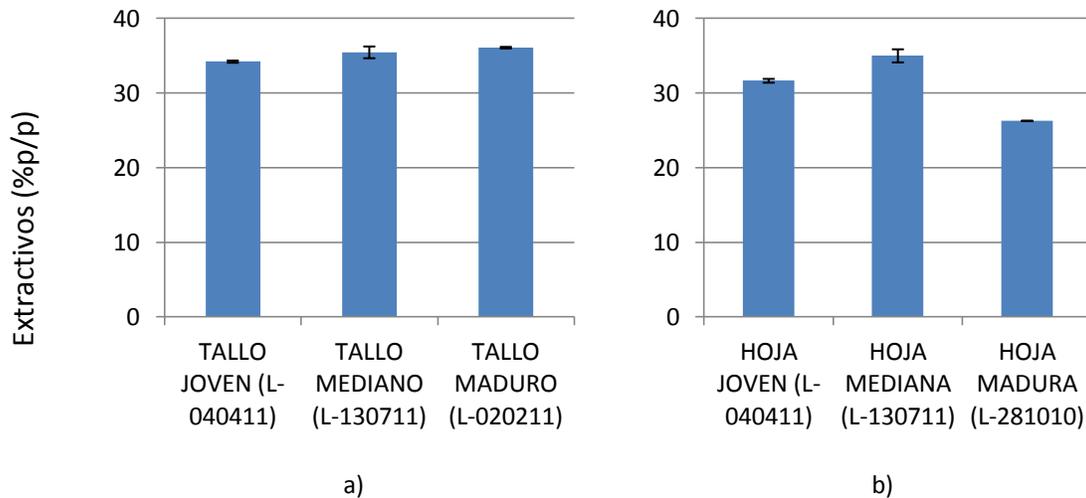
Gráfica 7.1.1. Contenido de extractivos en tallo y hoja maduros y lirio TEMA irradiado.

Sin embargo, debemos considerar que el lirio TEMA es colectado en la presa “Ignacio Ramírez” en Toluca, Estado de México, por lo que los factores que afectan su crecimiento son distintos a los de Xochimilco.

De acuerdo con *Tan y col., 2008*, el contenido de extractivos para la mezcla de tallo y hoja (igual al lirio TEMA irradiado) se encuentra alrededor del 15 – 17 ( $\text{g}_{\text{extractivos}}/100\text{g}_{\text{Ms}}$ ), estando por debajo de los promedios encontrados para nuestras muestras. Esto se puede deber a dos factores principalmente, el primero es el origen de las muestras. Mientras que nosotros obtuvimos las muestras de Toluca y Xochimilco, el grupo del investigador *Tan* las obtuvo del lago Yezhihu, en China; y el segundo es el método por el cual se hace la determinación, ya que en su caso utiliza una mezcla de benceno y etanol, por lo que no estaría extrayendo en un momento dado los componentes solubles en agua. Al parecer la segunda es la causa más probable en esta diferencia ya que *Chanakya y col., 1993*, reportan un contenido promedio de extractivos acuosos para la mezcla tallo y hoja deshidratados de 21.68 ( $\text{g}_{\text{extractivos}}/100\text{g}_{\text{Ms}}$ ), aproximándose en gran medida a lo que encontramos nosotros para muestras similares.

Parece ser que en el tallo no hay diferencia significativa en el contenido de extractivos conforme crece la planta, ya que el valor medio para el tallo joven (L-040411) fue de 34.21 y de 36.08 ( $\text{g}_{\text{extractivos}}/100\text{g}_{\text{Ms}}$ ) para el tallo maduro (L-020211) (Gráf. 7.1.2.a). En cambio para la fracción hoja hubo una disminución en el contenido de extractivos (aproximadamente del 25%) conforme se desarrolla la planta (aunque al principio pareciera haber un ligero aumento, sin embargo, por la magnitud del error experimental podemos decir que no hay diferencia significativa entre la hoja joven y mediana), ya que la media para la hoja joven fue de 31.64, mientras que para la hoja madura fue de tan solo 26.28 ( $\text{g}_{\text{extractivos}}/100\text{g}_{\text{Ms}}$ ). (Gráf. 7.1.2.b).

Cabe mencionar que en ninguna referencia han hecho estudios de acuerdo al grado de madurez, pero conforme a los resultados obtenidos nos podemos dar cuenta que los reportes se refieren a lirio acuático maduro, aparentemente mezcla de hoja y tallo.



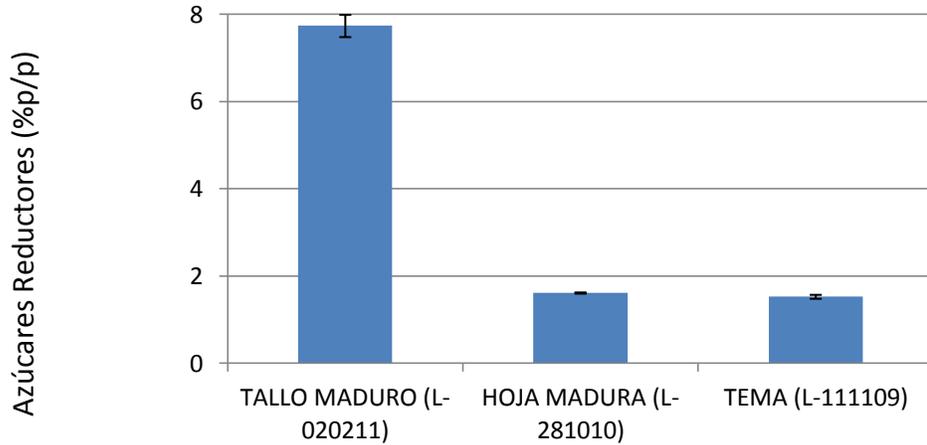
Gráfica 7.1.2. Cambios en el contenido de extractivos debidos al grado de madurez, a) tallo y b) hoja.

En conclusión, el contenido promedio de extractivos es siempre mayor en tallo que en hoja y mezcla tallo – hoja (TEMA). El contenido promedio de extractivos prácticamente no cambia en la fracción tallo conforme avanza el grado de madurez mientras que en la hoja disminuye casi en un 25%.

○ Azúcares reductores en el extracto acuoso

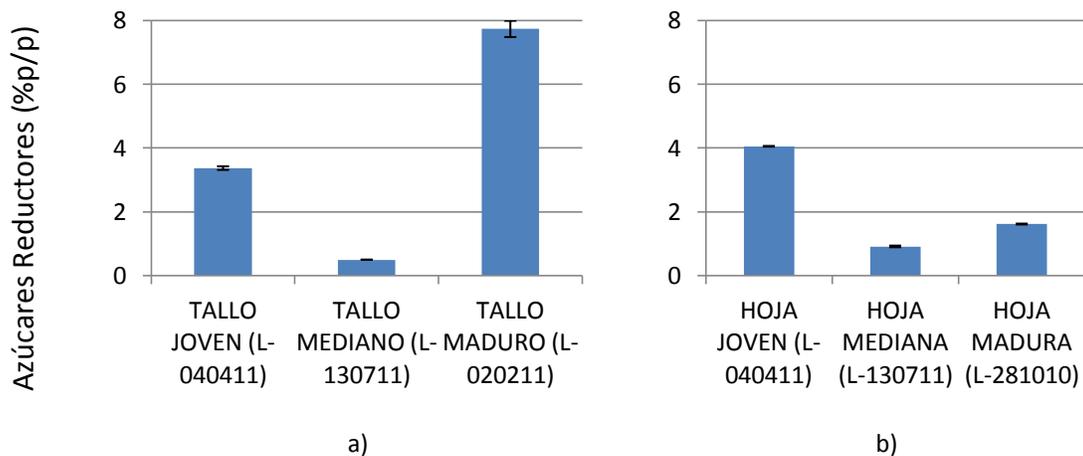
Los azúcares reductores son aquellos que en su estructura poseen un grupo funcional cetona (- CO -) o aldehído libre y gracias a ello es capaz de ceder electrones a otras moléculas y por lo tanto actuar como un agente reductor (*Julián y col., 1999*). Es de nuestro interés conocer la cantidad que existe de azúcares reductores en el extracto acuoso para poder determinar si es factible utilizar dicho extracto como un medio de cultivo para un proceso biotecnológico. Se calculó el contenido de azúcares reductores en los extractivos acuosos por el método del DNS (*Miller, 1959*) y se obtuvieron los resultados que aparecen en la tabla 7.1.4 (*Véase el Anexo I*).

El contenido de azúcares reductores en el lirio TEMA fue menor en comparación con las fracciones tallo y hoja maduros presentando valores promedio de 1.53, 7.74, y 1.61 ( $g_{Az. red}/100g_{Ms}$ ) respectivamente (Gráf. 7.1.3).



Gráfica 7.1.3. Contenido de azúcares reductores en el extracto acuoso de tallo y hoja maduros, y lirio TEMA irradiado.

El contenido de azúcares reductores en el extracto acuoso aumenta conforme la planta va creciendo en el caso del tallo, ya que la media encontrada para el tallo joven fue de 3.37 ( $g_{Az. red}/100g_{Ms}$ ) y aumentó hasta un valor medio de 7.74 ( $g_{Az. red}/100g_{Ms}$ ) en el tallo maduro (Gráf. 7.1.4.a). En el caso de la hoja muestra una tendencia contraria, ya que la media para la hoja joven fue de 4.05 ( $g_{Az. red}/100g_{Ms}$ ) mientras que para la hoja madura fue tan solo de 1.61 ( $g_{Az. red}/100g_{Ms}$ ) (Gráf. 7.1.4.b).

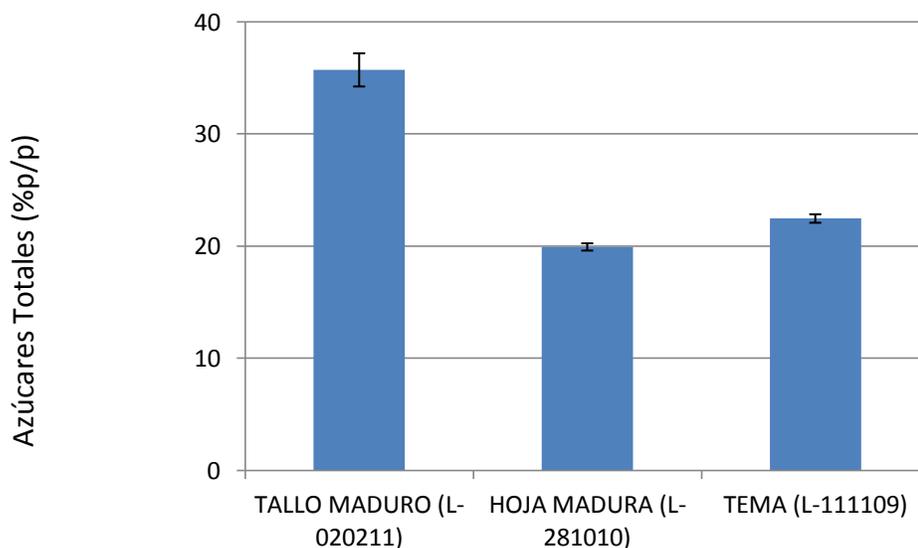


Gráfica 7.1.4. Cambios en el contenido de azúcares reductores en el extracto acuoso debidos al grado de madurez. a) tallo y b) hoja.

○ Azúcares totales en el extracto acuoso

Se evaluó también el contenido de azúcares totales en el extracto acuoso por el método del fenol – sulfúrico (*Dubois y col., 1956*) y se registraron los datos que se muestran en la tabla 7.1.5 (*Véase el Anexo I*). En este caso el objetivo de determinar este parámetro es establecer estrategias de hidrólisis tanto químicas como enzimáticas para llegar a sus monómeros constituyentes y proponer mecanismos de fermentación adecuados.

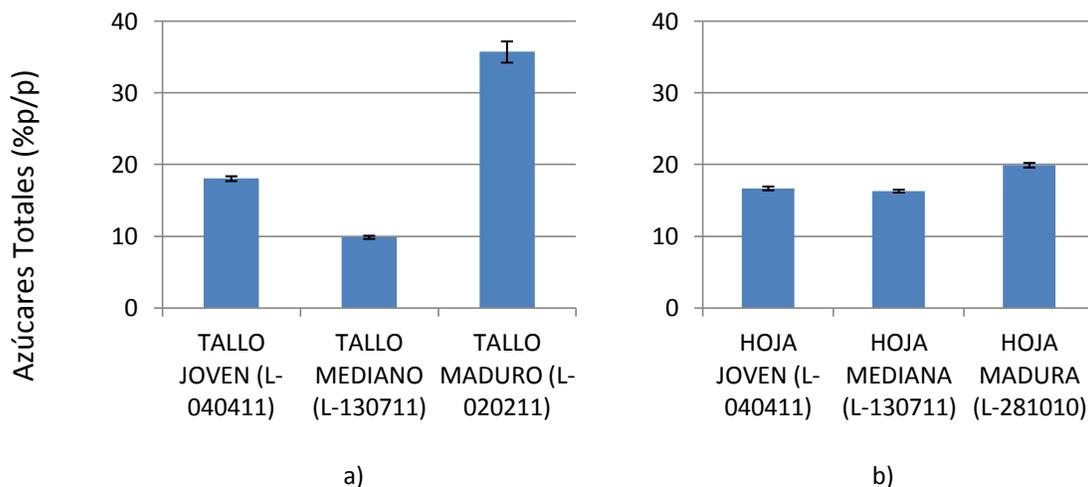
En general el contenido de azúcares totales fue mayor en tallo maduro con un promedio cercano a 36 ( $\text{g}_{\text{Az. totales}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ ) que en hoja y lirio tema irradiado que presentaron valores de, 20 y 22.5 ( $\text{g}_{\text{Az. totales}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ ) respectivamente, no habiendo diferencia significativa entre ellos (Gráf. 7.1.5).



Gráfica 7.1.5. Contenido de azúcares totales en el extracto acuoso de tallo y hoja maduros, y lirio TEMA irradiado.

Se encontró una tendencia similar a la descrita para los azúcares reductores, presentándose un aumento importante en tallo (cerca de 2 veces) conforme crece la planta, ya que para el tallo joven se obtuvo un valor promedio de 18.06 ( $\text{g}_{\text{Az. totales}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ )

y para el tallo maduro se cuantificó un 35.73 ( $\text{g}_{\text{Az. totales}}/100\text{g}_{\text{Ms}}$ ), que representa prácticamente el total de los extractivos acuosos en este caso, sin embargo al principio hay una disminución marcada en el contenido de azúcares totales que es de 9.89 ( $\text{g}_{\text{Az. totales}}/100\text{g}_{\text{Ms}}$ ) en el tallo mediano (Gráf. 7.1.6.a). En el caso de la hoja el contenido de azúcares totales aumentó ligeramente, registrándose un valor promedio de 16.07 ( $\text{g}_{\text{Az. totales}}/100\text{g}_{\text{Ms}}$ ) para la hoja joven, y de 19.94 ( $\text{g}_{\text{Az. totales}}/100\text{g}_{\text{Ms}}$ ) para la hoja madura, sin embargo no hubo diferencia significativa, ya que el promedio encontrado para la hoja mediana fue de 16.32 ( $\text{g}_{\text{Az. totales}}/100\text{g}_{\text{Ms}}$ ) (Gráf. 7.1.6.b).



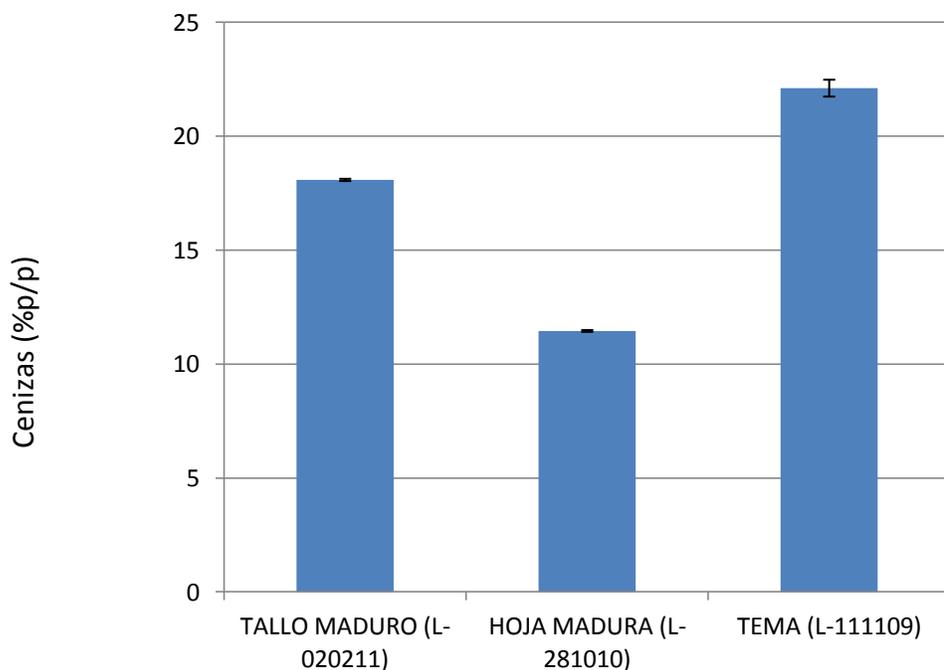
Gráfica 7.1.6. Cambios en el contenido de azúcares totales en el extracto acuoso debidos al grado de madurez, a) tallo y b) hoja.

No se encontraron referencias en las que tomen en cuenta el contenido de azúcares reductores ni totales en el extracto acuoso, ya que la mayoría de las propuestas que existen optan por un pretratamiento ácido suave y utilizan el hidrolizado como medio ya sea para fermentación o generación de biogás (*Nigam, 2002*). Los resultados encontrados sugieren la posibilidad de ver al extracto acuoso como una potencial fuente de polisacáridos que bien podrían destinarse a fermentación o a la obtención y evaluación de moléculas con posible uso como fibra alimentaria (oligómeros, xilanos y arabinosilanos) (*Grootaert y col., 2007*).

Con los datos encontrados en esta sección concluimos que el contenido promedio de azúcares reductores y totales en el extracto acuoso es siempre mayor en tallo que en hoja y la mezcla tallo – hoja. Conforme la planta se desarrolla aumenta el contenido de azúcares totales y reductores en el extracto acuoso del tallo, mientras que en el extracto acuoso de la hoja el contenido de azúcares totales prácticamente no cambia y disminuye el contenido de azúcares reductores.

## ⊕ CENIZAS

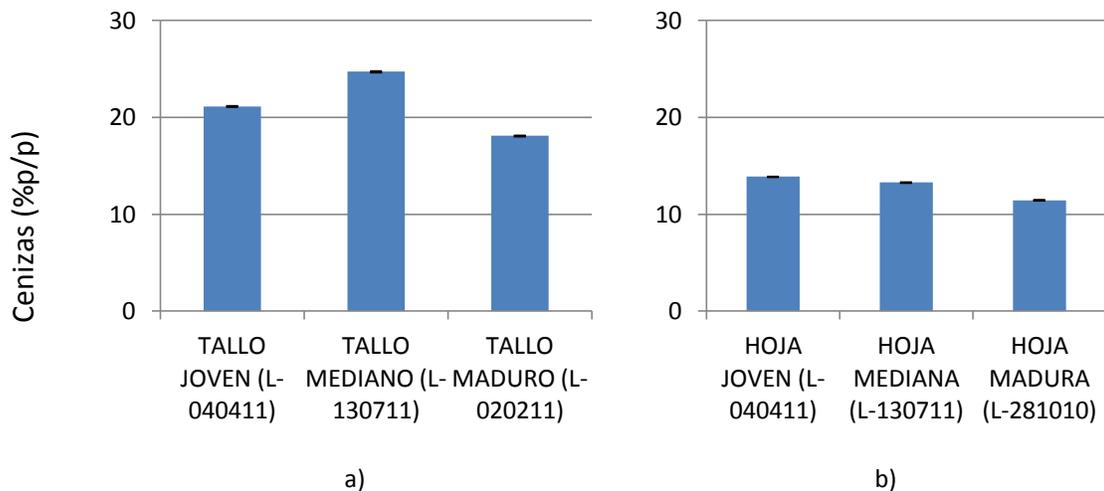
Se calculó el contenido de cenizas por calcinación de acuerdo a la técnica descrita por *Sluiter y col., 2005a*. Los resultados se muestran en la tabla 7.1.6 (*Véase el Anexo I*). El contenido de cenizas fue mayor en tallo y en lirio TEMA que presentan una media de 18.01 y de 22.11 ( $g_{\text{cenizas}}/100g_{\text{Ms}}$ ) comparados con la fracción hoja que solo presenta un contenido de 11.46 ( $g_{\text{cenizas}}/100g_{\text{Ms}}$ ) (Gráf. 7.1.7).



Gráfica 7.1.7. Contenido de cenizas en tallo y hoja maduros, y lirio TEMA irradiado.

En el caso de tallo coincide con los contenidos promedio reportados por *Patel y col., 1993*, por *Lindsey y Hirt, 2000* y por *Bhattacharya y Kumar, 2010*, quienes reportan contenidos de cenizas de 20 ( $\text{g}_{\text{cenizas}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ ) en promedio. Esto nos da un indicio de que en estos trabajos se está utilizando solo la fracción tallo maduro o bien la mezcla hoja – tallo ambos maduros para llevarlos a cabo.

Se encontraron los valores promedio para el tallo joven que fue de 21.13 y de 18.08 ( $\text{g}_{\text{cenizas}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ ) para el tallo maduro. La fracción hoja presentó una tendencia muy parecida, siendo sus promedios de 13.86 y 11.45 ( $\text{g}_{\text{cenizas}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ ) para hoja joven y madura respectivamente, es decir que en ambas fracciones el contenido de cenizas tiende a disminuir conforme la planta se desarrolla (Gráf. 7.1.8. a y b).



Gráfica 7.1.8. Cambios en el contenido de cenizas debidos al grado de madurez, a) tallo y b) hoja.

En conclusión el contenido de cenizas es mayor en tallo y mezcla tallo – hoja que en la fracción hoja. El contenido de cenizas disminuye ligeramente conforme la planta crece tanto en tallo como en hoja.

## ⊖ LIGNINA

La lignina es un polímero aromático, amorfo, hidrófobo y de estructura tridimensional; en el espacio, está compuesta de enlaces C – O – C y C – C. Se forma por un complejo arreglo de unidades fenólicas sustituidas, principalmente de unidades de fenil – propano y tiene varias funciones, entre ellas la de mantener las fibras unidas, dar rigidez a la planta y de protección contra los ataques físicos y químicos propios del medio ambiente.

Se encuentra depositada en la pared celular y se forma por la reacción de sus principales precursores que son: 1) el alcohol *p* – cumarílico, 2) alcohol coniferílico y 3) alcohol sinapílico (Fig. 7.1.1). El tipo de enlace comúnmente en la lignina es el  $\beta$  - aril éter (Rowell y col., 2005).

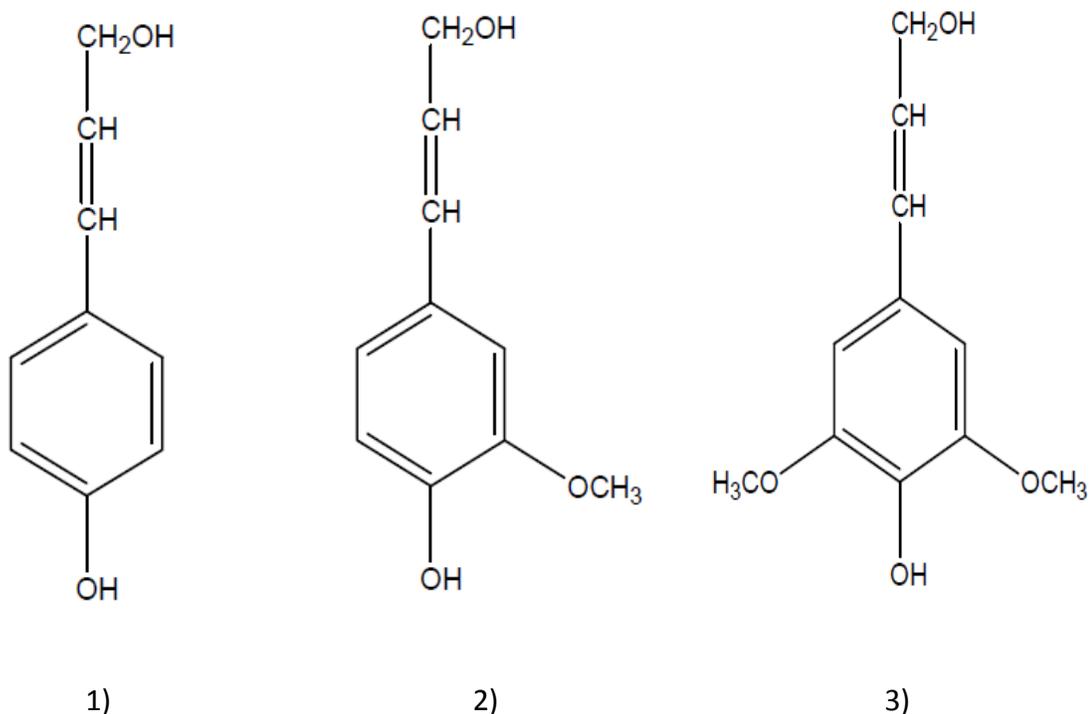
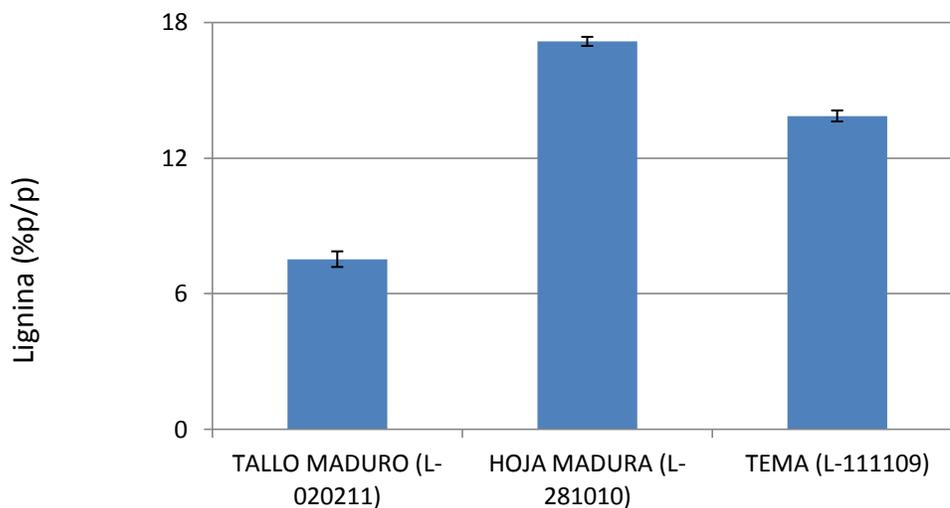


Figura. 7.1.1 Principales precursores en la biosíntesis de lignina<sup>a</sup>.  
<sup>a</sup> Tomada de: Sjöström, 1993.

Se cuantificó el contenido promedio de lignina (*Modificación de Kálmán y col., 2002, Ramos, 2003 y Nabarlatz y col., 2004*) en las fracciones de tallo, hoja maduros y en lirio TEMA irradiado. Estos resultados se resumen en la tabla 7.1.7 (*Véase el Anexo I*).

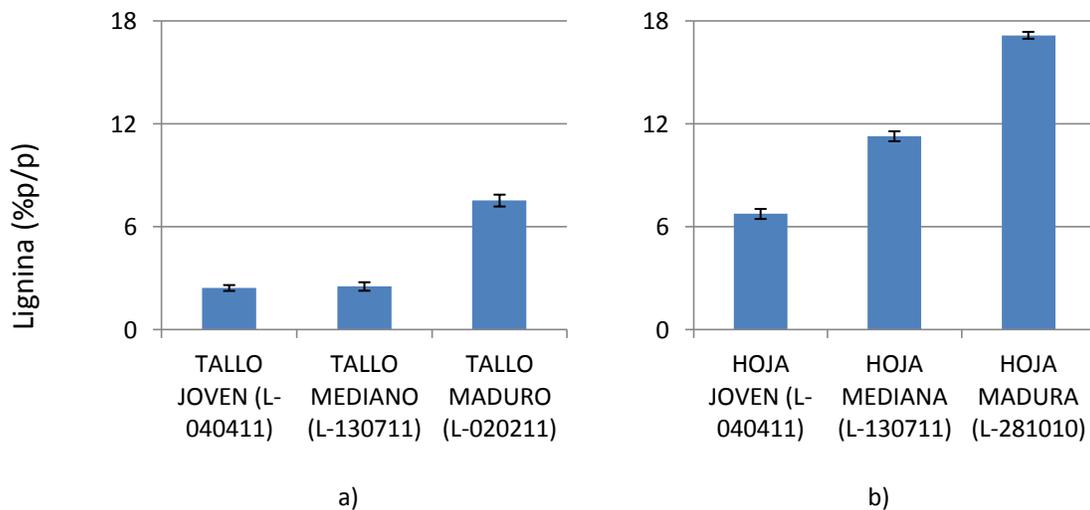
El lirio TEMA mostró un contenido promedio menor a la hoja y mayor al tallo maduro, siendo sus valores promedio de 13.86, 17.16 y 7.53 ( $\text{g}_{\text{Lignina}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ ) respectivamente (Gráf. 7.1.9).



Gráfica 7.1.9. Contenido de lignina en tallo y hoja maduros, y lirio TEMA irradiado.

De acuerdo a los datos reportados por varios grupos de investigación, podemos ver que se encuentran muy similares a los encontrados por nuestro grupo de trabajo, entre ellos tenemos a *Tan y col., 2008*, que reportan 11.55 ( $\text{g}_{\text{Lignina}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ ); a *Bhattacharya y Kumar, 2010*, que reportaron un contenido de 10 ( $\text{g}_{\text{Lignina}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ ); a *Patel y col., 1993*, que reportaron un contenido de lignina de 7.8 ( $\text{g}_{\text{Lignina}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ ) y *Lindsey y Hirt, 2000*, reportaron 14 ( $\text{g}_{\text{Lignina}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ ). De aquí podemos deducir que en estos trabajos se utilizó mezcla de hoja y tallo maduros para llevar a cabo las investigaciones.

El contenido de lignina en tallo muestra un aumento de casi tres veces en la planta madura en comparación con la planta joven, siendo sus valores promedio de 2.43 y 7.5 ( $\text{g}_{\text{Lignina}}/100\text{g}_{\text{Ms}}$ ) para el tallo joven y maduro respectivamente. Las hojas presentaron el mayor contenido de lignina en cualquier estado de madurez y una tendencia similar al tallo, observándose un aumento de 2.5 veces el contenido inicial, cuantificándose 6.75 ( $\text{g}_{\text{Lignina}}/100\text{g}_{\text{Ms}}$ ) y 17.16 ( $\text{g}_{\text{Lignina}}/100\text{g}_{\text{Ms}}$ ) para hoja joven y madura respectivamente (Gráf. 7.1.10. a y b).



Gráfica 7.1.10. Cambios en el contenido de lignina debidos al grado de madurez, a) tallo y b) hoja.

Sin embargo, también nos damos cuenta que en el trabajo que reportó *Nigam* en 2002 utilizó tallo joven o en una etapa temprana de crecimiento debido al contenido de lignina que encontró que fue de 3.5 ( $\text{g}_{\text{Lignina}}/100\text{g}_{\text{Ms}}$ ) y es el dato que da lugar a este proyecto de investigación, ya que se sabe que un bajo contenido de lignina vuelve a los polisacáridos estructurales excelente fuentes de azúcares tanto para fermentación como para su uso como moléculas de alto valor agregado (*Chanakya y col. 1993; Ramos, 2003*).

De los resultados que obtuvimos en este análisis llegamos a la conclusión que el mayor contenido de lignina se encuentra en la fracción hoja y que conforme la planta se desarrolla se eleva el contenido promedio de lignina tanto en tallo como en hoja.

## ⊖ HEMICELULOSA

En general, las hemicelulosas consisten en una serie de polisacáridos de bajo grado de polimerización (DP entre 100 – 200) y está conformado principalmente por los monómeros D - glucosa, D - manosa, D - galactosa, D - xilosa, L - arabinosa y pequeñas cantidades de L - ramnosa y otros azúcares, además de ácido D - glucurónico, 4 - O - metil - D - glucurónico y D - galacturónico (Fig. 7.1.2) (Sjöström, 1993; Rowell y col., 2005).

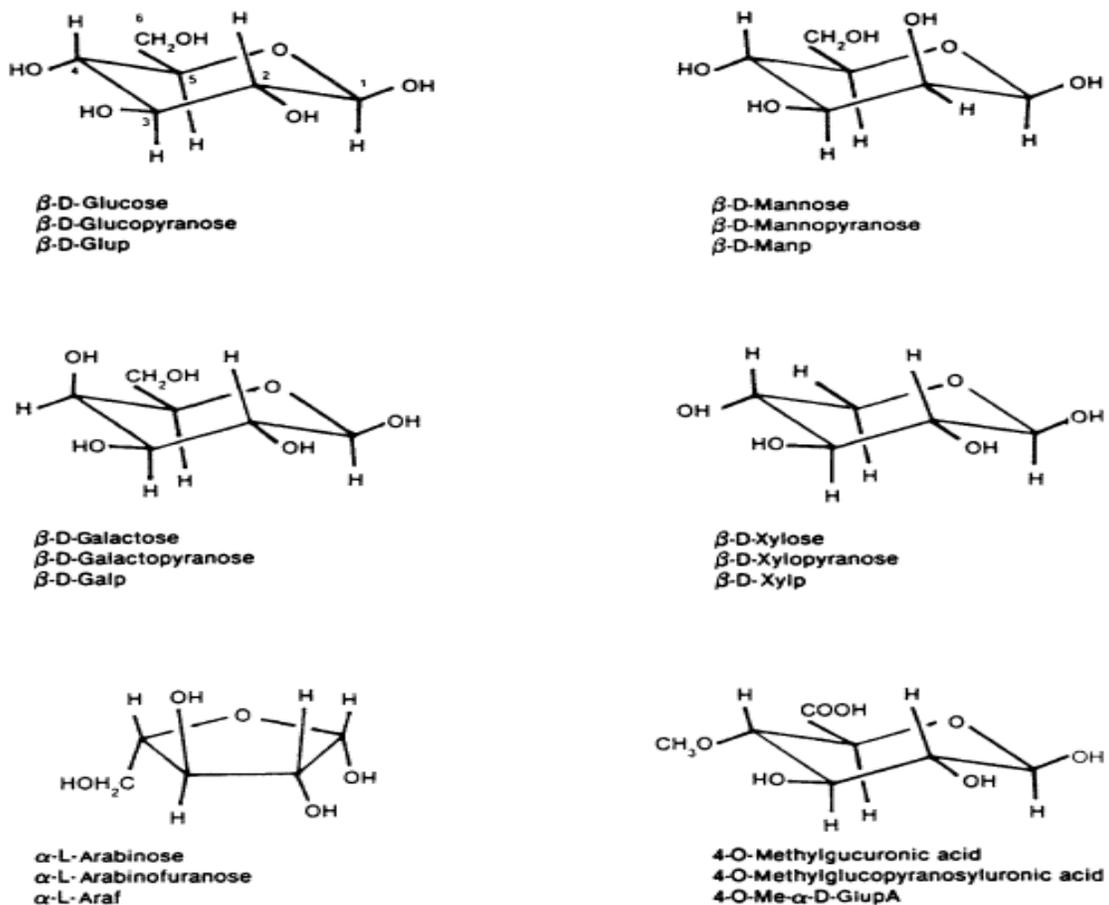


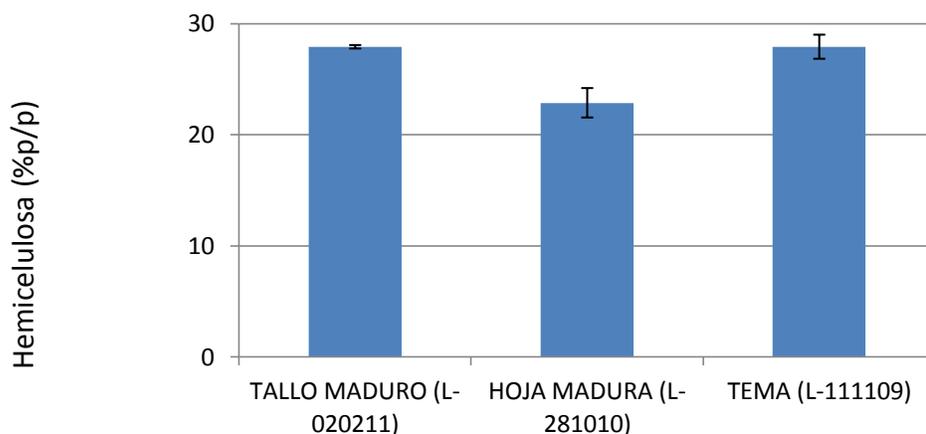
Figura. 7.1.2 Precursores de las hemicelulosas<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Tomada de: Rowell y col., 2005.

Las hemicelulosas están íntimamente ligadas a la celulosa y actúan como compuestos estructurales de la planta. Se conforman de monómeros unidos por enlaces  $\beta$ –(1→4) con puntos de ramificación en (1→2), (1→3) y (1→6). Se dividen en 4 grupos generales que son: xilanos, mananos,  $\beta$  – glucanos y xiloglucanos. Son solubles en álcali y son hidrolizadas fácilmente por ácidos. Precipitan de las soluciones alcalinas por acidificación con ácido acético. El tratamiento de la solución acidificada con disolventes orgánicos resulta en una mejor precipitación de las hemicelulosas. La estructura de las hemicelulosas no ha sido detallada aún, solo se han estudiado las relaciones entre el contenido de monómeros del polisacárido (Ebringerová y col., 2005; Rowell y col., 2005).

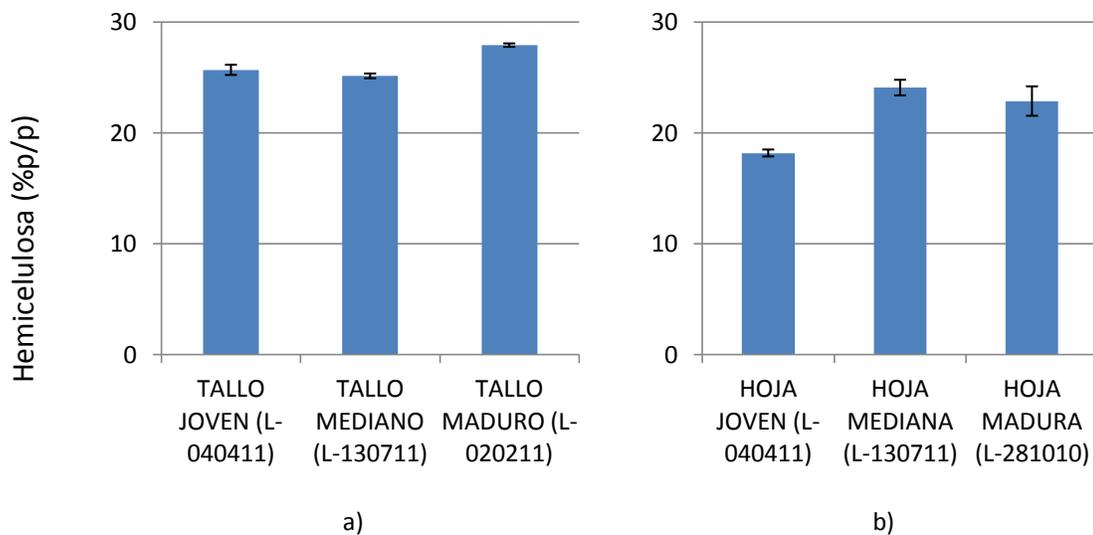
Se evaluó el contenido de hemicelulosa por medio de modificaciones a las técnicas descritas por Kálmán y col., 2002; Ramos, 2003; Nabarlantz y col., 2004 y los resultados se muestran en la tabla 7.1.8 (Véase el Anexo I).

En el caso de lirio irradiado TEMA se encontró un valor promedio del contenido de hemicelulosa de 27.92 ( $g_{HC}/100g_{Ms}$ ), siendo prácticamente igual para tallo y ligeramente mayor que para hoja, siendo sus valores de 27.91 y 22.87 ( $g_{HC}/100g_{Ms}$ ) respectivamente (Graf. 7.1.11).



Gráfica 7.1.11. Contenido de hemicelulosa en tallo y hoja maduros, y lirio TEMA irradiado.

En el caso del tallo se observó un ligero aumento en el contenido promedio de hemicelulosa conforme se desarrolla la planta, sin embargo no hubo una diferencia marcada, siendo los valores promedio de 25.68 ( $\text{g}_{\text{HC}}/\text{100g}_{\text{MS}}$ ) para el tallo joven y de 27.91 ( $\text{g}_{\text{HC}}/\text{100g}_{\text{MS}}$ ) en el tallo maduro. En el caso de la hoja hay un aumento en el contenido de hemicelulosa entre hoja joven y hoja mediana y un decremento al alcanzar la madurez, sus valores promedio medidos fueron de 18.18 ( $\text{g}_{\text{HC}}/\text{100g}_{\text{MS}}$ ), 24.08 ( $\text{g}_{\text{HC}}/\text{100g}_{\text{MS}}$ ) y 22.87 ( $\text{g}_{\text{HC}}/\text{100g}_{\text{MS}}$ ) respectivamente para hoja joven mediana y madura (Gráf. 7.1.12. a y b).



Gráfica 7.1.12. Cambios en el contenido de hemicelulosa debidos al grado de madurez, a) tallo y b) hoja.

Estos datos son muy semejantes a los datos que reportó *Tan y col., en 2008*, para el contenido promedio de hemicelulosa que fue de 27.41 ( $\text{g}_{\text{HC}}/\text{100g}_{\text{MS}}$ ) y a los reportados por *Lindsey y Hirt, 2000*, de 21 ( $\text{g}_{\text{HC}}/\text{100g}_{\text{MS}}$ ). Sin embargo están muy por debajo de lo que reportan otros autores como *Bhattacharya y Kumar, 2010; Patel y col., 1993; Nigam, 2002*, que reportan contenidos de hemicelulosa desde 35 y hasta 48.70 ( $\text{g}_{\text{HC}}/\text{100g}_{\text{MS}}$ ). Estas variaciones en los datos reportados se pueden deber a las diferentes técnicas que se utilizan para cuantificar estos componentes y a la gran diversidad de modificaciones que hay de cada una, también a que no hay referencias que tomen en cuenta el grado de madurez y factores como el lugar de origen de la planta.

Un problema con el que nos topamos es que no existe una metodología estandarizada para llevar a cabo estos análisis. En nuestro caso implementamos las modificaciones que desarrolló el grupo de trabajo de *Pedraza y Toribio* en el Departamento de Bioingeniería de la Universidad Iberoamericana a las técnicas reportadas por diversos autores y que fueron mencionados anteriormente.

En conclusión, el mayor contenido de hemicelulosa está en la fracción tallo y en la mezcla tallo – hoja y tanto en la fracción de tallo como en la de hoja, hay un ligero aumento en el contenido de hemicelulosa conforme la planta avanza en su estado de madurez.

## ⊖ CELULOSA

La celulosa es el compuesto orgánico más abundante en la superficie terrestre. Es un polímero de glucanos conformados por unidades de glucosa unidas entre sí por enlaces glicosídicos  $\beta$  – (1 $\rightarrow$ 4). Pero, la unidad fundamental de la celulosa es la celobiosa, ya que es este dímero el que se repite (Fig. 7.1.3).

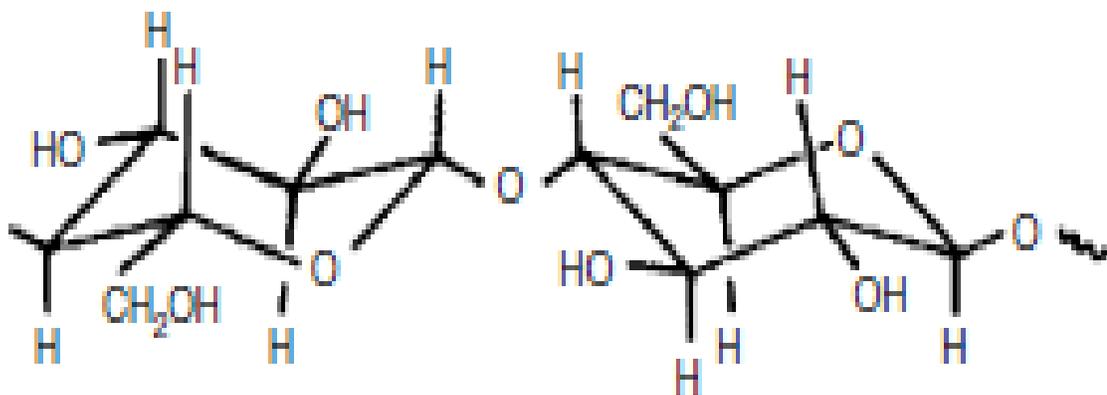


Figura. 7.1.3 La celobiosa es la unidad fundamental de la celulosa<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Tomada de: *Rowell y col., 2005.*

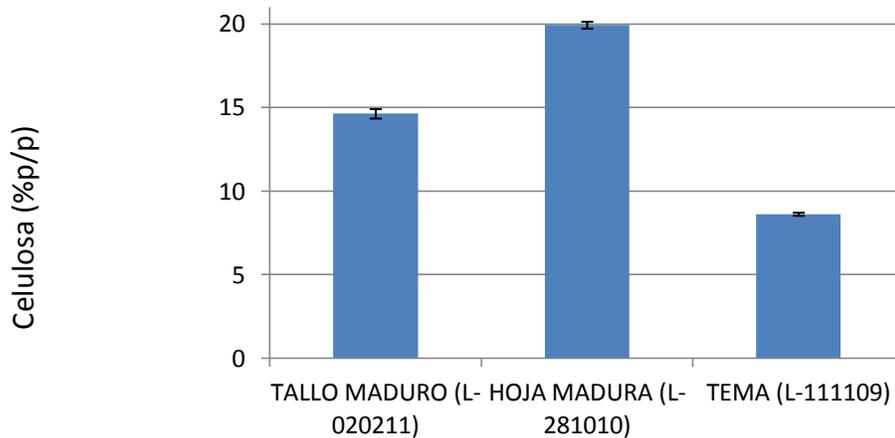
El número de unidades dentro de la celulosa se conoce como grado de polimerización y en promedio se ha encontrado que oscila entre 9,000 y 10,000, y en algunas ocasiones hasta de 15,000.

Las fibras de celulosa se orientan al azar y por ello tienden a formar puentes de hidrógeno intra e intermoleculares. Es por ello que se ha observado que existen varios tipos de celulosa, principalmente las denominadas cristalina y no cristalina, y las accesibles y no accesibles. Estas últimas se refieren a la facilidad con que puede ser alcanzada por diferentes agentes como puede ser el agua o los microorganismos. La mayor parte de la celulosa no cristalina es del tipo accesible, sin embargo la parte cristalina se encuentra cubierta por las hemicelulosas y lignina que la protegen.

Es insoluble en la mayoría de los disolventes, incluyendo soluciones alcalinas. Las soluciones alcalinas fuertes logran hinchar las fibras de celulosa pero no la disuelven. Se ha visto que la celulosa solo logra disolverse en soluciones muy ácidas, por ejemplo, ácido sulfúrico al 72%, ácido clorhídrico al 42% y ácido fosfórico al 85%, sin embargo esto implica su degradación (hidrólisis) (Rowell y col., 2005).

El contenido de celulosa, de igual manera se cuantificó por las modificaciones a realizadas a las técnicas descritas por Kálmán y col., 2002; Ramos, 2003; Nabarlatz y col., 2004. Los resultados se resumen en la tabla 7.1.9 (Véase Anexo I).

El contenido promedio de celulosa en el lirio irradiado fue de 8.63 ( $\text{g}_{\text{Cel}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ ), que, como puede observarse fue menor en comparación con las fracciones tallo y hoja que presentaron un contenido promedio de celulosa de 14.63 y 19.93 ( $\text{g}_{\text{Cel}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ ) (Gráf. 7.1.13).

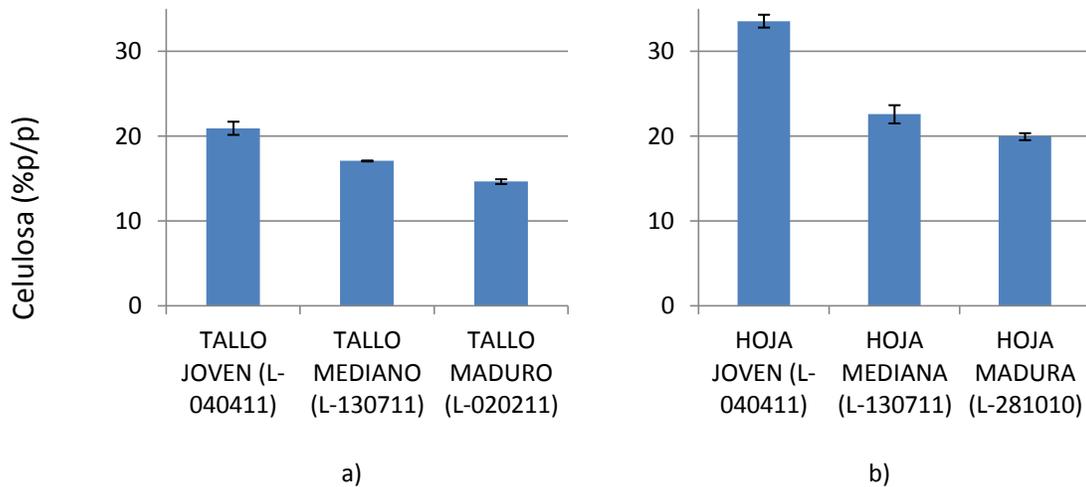


Gráfica 7.1.13. Contenido de celulosa en tallo y hoja maduros, y lirio TEMA irradiado.

En la fracción tallo se presenta una notable disminución en el contenido promedio de celulosa siendo el valor para el tallo joven de 20.93 ( $g_{Cel}/100g_{Ms}$ ), mientras que para el tallo maduro fue de 14.63 ( $g_{Cel}/100g_{Ms}$ ), siendo la disminución de cerca del 30% respecto al contenido inicial. De igual manera, el contenido de celulosa en hoja se ve disminuido, pero en este caso fue más severo el decremento en el contenido de celulosa, ya que los valores registrados para hoja joven y madura son de 33.55 ( $g_{Cel}/100g_{Ms}$ ) y 19.93 ( $g_{Cel}/100g_{Ms}$ ) respectivamente, siendo el decremento cercano al 42% (Gráf. 7.1.14. a y b).

De acuerdo a nuestros resultados, podemos ver que encontramos un contenido promedio de celulosa semejante al promedio que reporta Patel 1993, que es de 17.8 ( $g_{Cel}/100g_{Ms}$ ) y Nigam en 2002 que es de 18.2 ( $g_{Cel}/100g_{Ms}$ ) en cuanto a tallo y hoja se refiere, sin embargo en el caso del lirio TEMA irradiado reportamos un valor muy bajo. Haciendo la comparación con diversos autores vimos que prácticamente todos encontraron un promedio en el contenido de celulosa por encima de lo que registramos nosotros estando entre 25 y 32 ( $g_{Cel}/100g_{Ms}$ ). Creemos que estas diferencias son debidas a que casi ningún grupo de trabajo reportó que parte de la planta ni el estado de madurez de la misma utilizó para hacer sus análisis, ya que con el valor que encontramos para hoja joven

podemos ver que estamos prácticamente en el mismo promedio que lo reportado por ellos.



Gráfica 7.1.14. Cambios en el contenido de celulosa debidos al grado de madurez, a) tallo y b) hoja.

Con base en estos resultados podemos concluir que el mayor contenido de celulosa está en la fracción hoja, y que conforme la planta se desarrolla hay una disminución en ambas fracciones (tallos y hoja).

## ⊖ DISCUSIÓN GENERAL

En resumen, se logró caracterizar la composición del lirio acuático dependiendo de su grado de madurez. Cabe señalar que falta aún establecer técnicas analíticas que nos permitan tener magnitudes de error menores ya que con las técnicas actuales se tienen muchos factores que no se pueden controlar. Sin embargo la gran mayoría de los resultados obtenidos se encuentran por debajo del 10% de error.

En general el mayor contenido de extractivos, cenizas y hemicelulosa se encuentran en la fracción tallo, mientras que en la fracción hoja se encuentra un mayor contenido de lignina y celulosa.

En la tabla 7.1.10 se resumen las composiciones de la fracciones tallo y hoja maduras y el lirio TEMA irradiado que fueron nuestras referencias.

**Tabla 7.1.10. Composición promedio de las fracciones tallo y hoja y lirio TEMA irradiado.**

Componente	TALLO MADURO (L-020211)	HOJA MADURA (L-281010)	TEMA IRRADIADO (L-111109)
Extractivos ( $g_{\text{extractivos}}/100g_{\text{Ms}}$ )	36.08 ± 0.21	26.28 ± 0.07	24.16 ± 0.95
Azúcares Reductores en el extracto acuoso ( $g_{\text{Az. red}}/100g_{\text{Ms}}$ )	7.74 ± 0.51	1.61 ± 0.03	1.53 ± 0.09
Azúcares Totales en el extracto acuoso ( $g_{\text{Az. totales}}/100g_{\text{Ms}}$ )	35.73 ± 2.96	19.94 ± 0.65	22.48 ± 1.43
Cenizas ( $g_{\text{cenizas}}/100g_{\text{Ms}}$ )	18.08 ± 0.1	11.46 ± 0.08	22.11 ± 0.74
Lignina ( $g_{\text{Lignina}}/100g_{\text{Ms}}$ )	7.53 ± 0.69	17.16 ± 0.40	13.86 ± 0.49
Hemicelulosa ( $g_{\text{Hc}}/100g_{\text{Ms}}$ )	27.91 ± 0.31	22.87 ± 2.65	27.92 ± 2.17
Celulosa ( $g_{\text{Cel}}/100g_{\text{Ms}}$ )	14.63 ± 0.56	19.93 ± 0.42	8.63 ± 0.18

± Desviación estándar de los triplicados.

En las tablas 7.1.11 y 7.1.12 se resumen las composiciones de la fracción tallo y hoja respectivamente en función de su estado de madurez.

En conclusión, en la fracción tallo el contenido de extractivos, azúcares reductores y totales, lignina y hemicelulosa aumenta conforme la planta avanza en su estado de madurez sucediendo lo contrario en el contenido de cenizas y celulosa que disminuye significativamente.

En el caso de la fracción hoja se presenta un aumento en los contenidos de azúcares totales, lignina y hemicelulosa y una disminución en los contenidos promedio de extractivos, azúcares reductores, cenizas y celulosa.

**Tabla 7.1.11. Composición promedio de la fracción tallo de lirio acuático.**

Componente	TALLO JOVEN (L-040411)	TALLO MEDIANO (L-130711)	TALLO MADURO (L-020210)
Extractivos ( $g_{\text{extractivos}}/100g_{\text{Ms}}$ )	34.21 ± 0.29	35.46 ± 1.57	36.08 ± 0.21
Azúcares Reductores en el extracto acuoso ( $g_{\text{Az. red}}/100g_{\text{Ms}}$ )	3.37 ± 0.11	0.50 ± 0.01	7.74 ± 0.51
Azúcares Totales en el extracto acuoso ( $g_{\text{Az. totales}}/100g_{\text{Ms}}$ )	18.06 ± 0.68	9.89 ± 0.45	35.73 ± 2.96
Cenizas ( $g_{\text{cenizas}}/100g_{\text{Ms}}$ )	21.13 ± 0.10	24.71 ± 0.14	18.08 ± 0.10
Lignina ( $g_{\text{Lignina}}/100g_{\text{Ms}}$ )	2.43 ± 0.34	2.52 ± 0.49	7.53 ± 0.69
Hemicelulosa ( $g_{\text{Hc}}/100g_{\text{Ms}}$ )	25.68 ± 0.92	25.14 ± 0.44	27.91 ± 0.31
Celulosa ( $g_{\text{Cel}}/100g_{\text{Ms}}$ )	20.93 ± 1.55	17.10 ± 0.11	14.63 ± 0.56

± Desviación estándar de los triplicados.

**Tabla 7.1.12. Composición promedio de la fracción hoja de lirio acuático.**

Componente	HOJA JOVEN (L-040411)	HOJA MEDIANA (L-130711)	HOJA MADURA (L-281010)
Extractivos ( $g_{\text{extractivos}}/100g_{\text{Ms}}$ )	31.65 ± 0.51	34.99 ± 1.75	26.28 ± 0.07
Azúcares Reductores en el extracto acuoso ( $g_{\text{Az. red}}/100g_{\text{Ms}}$ )	4.05 ± 0.02	0.91 ± 0.05	1.61 ± 0.03
Azúcares Totales en el extracto acuoso ( $g_{\text{Az. totales}}/100g_{\text{Ms}}$ )	16.70 ± 0.53	16.33 ± 0.40	19.94 ± 0.65
Cenizas ( $g_{\text{cenizas}}/100g_{\text{Ms}}$ )	13.87 ± 0.05	13.28 ± 0.07	11.46 ± 0.08
Lignina ( $g_{\text{Lignina}}/100g_{\text{Ms}}$ )	6.75 ± 0.58	11.28 ± 0.58	17.16 ± 0.40
Hemicelulosa ( $g_{\text{Hc}}/100g_{\text{Ms}}$ )	18.19 ± 0.63	24.08 ± 1.40	22.87 ± 2.65
Celulosa ( $g_{\text{Cel}}/100g_{\text{Ms}}$ )	33.56 ± 0.76	22.58 ± 1.07	19.93 ± 0.42

± Desviación estándar de los triplicados.

## 7.2. SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES A Y B DE LA HEMICELULOSA DE LIRIO ACUÁTICO.

Para separar las fracciones A y B de hemicelulosa se aplicó el método descrito por Du Toit y col., 1984, con la finalidad de analizar sus propiedades como fibra alimentaria. Los datos se presentan en la tabla 7.2.1. En este experimento solo se utilizó tallo y hoja maduros.

Como se puede observar, el mayor contenido de hemicelulosa está en el tallo. Este dato coincide con lo que encontramos para el análisis de hemicelulosa en el método termoquímico y alcalino – peróxido descrito anteriormente, en el sentido de que siempre la fracción tallo posee la mayor cantidad de hemicelulosa, sin embargo el contenido promedio que encontramos fue numéricamente menor, lo que nos indica que el método alcalino subestima la cantidad de hemicelulosa real ya que no logra separar la lignina, provocando que parte de la hemicelulosa quede atrapada y por lo tanto no sea cuantificable.

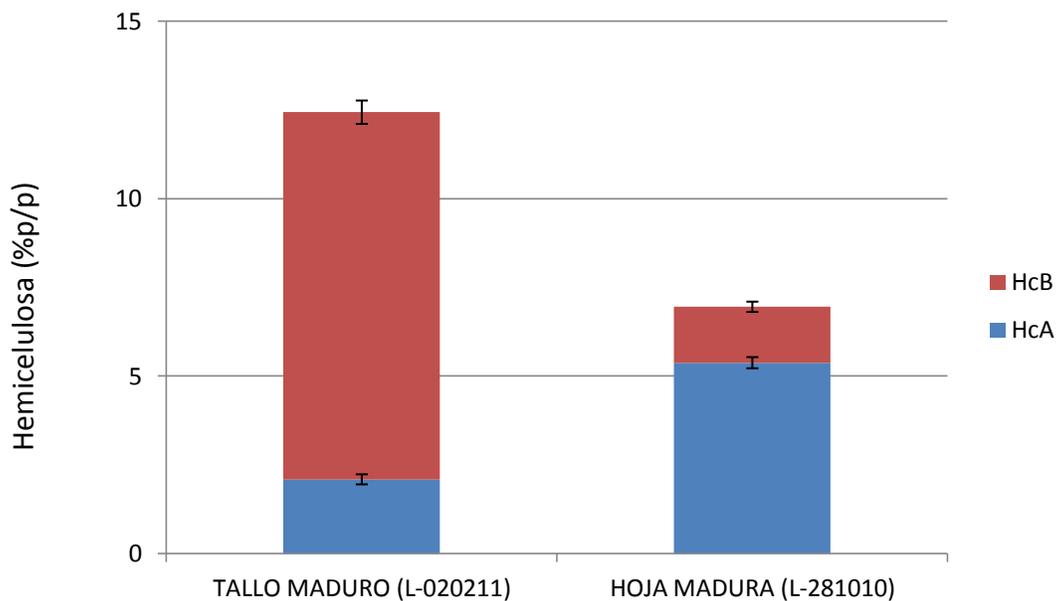
**Tabla 7.2.1. Resultados de la extracción de las fracciones A y B de hemicelulosa en tallo y hoja.**

<b>Tipo de hemicelulosa</b>	<b>Contenido promedio (g/100g<sub>MS</sub>)</b>
<b>TALLO MADURO (L-020211)</b>	
Hemicelulosa A	2.09 ± 0.28
Hemicelulosa B	10.34 ± 0.66
Hemicelulosa Total	12.43 ± 0.80
<b>HOJA MADURA (L-281010)</b>	
Hemicelulosa A	5.38 ± 0.32
Hemicelulosa B	1.58 ± 0.29
Hemicelulosa Total	6.95 ± 0.06

± Desviación estándar de los triplicados.

A diferencia de los métodos termoquímico y alcalino – peróxido este método no destruye la fracción A de la hemicelulosa por lo que a través de este la pudimos cuantificar, además de obtener la muestra para su evaluación como fibra alimentaria.

Se observó que el tallo posee una mayor cantidad de hemicelulosa B y una baja cantidad de hemicelulosa A en una proporción 80:20, mientras que en la hoja la situación es inversa ya que esta contiene en mayor proporción hemicelulosa A y poca de B teniendo una proporción 75:25 (Gráf. 7.2.1).



Gráfica 7.2.1. Contenido de Hemicelulosa A y B en tallo y hoja maduros.

De acuerdo a los resultados obtenidos y en base a resultados que no se muestran en este trabajo se decidió que la mejor opción es la hemicelulosa B de tallo para evaluar su posible uso como fibra alimentaria y determinar su composición en cuanto a su contenido de xilosa, arabinosa y grado de acetilación, que es lo que diferencia a las fracciones A y B.

### 7.3. CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DEBIDOS AL TRATAMIENTO BIOTECNOLÓGICO

En este trabajo pretendemos obtener una degradación controlada de los polímeros estructurales del lirio acuático. Para ello se han propuesto diferentes maneras de llevarlo cabo. Existen los tratamientos químicos con soluciones de ácidos inorgánicos o álcalis, sin embargo con ello se generan compuestos tóxicos tales como el 5 - hidroximetilfurfural y el furfural. Además de que con un procedimiento de este tipo se genera mayor contaminación. Por ello se han propuesto mecanismos biológicos, tal como la hidrólisis enzimática a partir de enzimas asiladas de hongos filamentosos o usando el lirio como soporte en una fermentación en medio sólido.

En esta sección se presentan los resultados que se obtuvieron cuando se utilizó el lirio acuático del lote L-**111109** irradiado (10 KGy), como soporte en una fermentación controlada con un hongo filamentoso (este trabajo solo caracteriza la composición del lirio antes y después del tratamiento, no se presentan los datos ni la metodología utilizada para la fermentación). Debo hacer mención y agradecimiento a la Dra. Luz Tovar quien amablemente nos proporcionó las muestra para su análisis.

El lirio "**ACONDICIONADO**" es el lirio acuático, molido y tamizado en malla 16, tratado con 1.5mL de solución de ácido sulfúrico 0.25M por cada gramo de materia seca y posteriormente esterilizado a 15psi por 15min.

El lirio "**TIEMPO INICIAL**" es el lirio acondicionado al que se le agregó el medio de cultivo y la solución de esporas. Se tomó la muestra inmediatamente, se secó y se molió.

El lirio "**TIEMPO FINAL**" es el lirio después de 48h de fermentación. Una vez transcurrido el tiempo de fermentación se tomó la muestra, se seco y se molió.

⊖ HUMEDAD

Se midió el contenido de humedad (*Sluiter y col., 2008*) en el lirio acondicionado sin "inocular", al tiempo inicial y al tiempo final molidos para poder calcular el contenido de sólidos totales. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7.3.1.

**Tabla 7.3.1. Resultados del análisis de humedad.**

Lote	Humedad (%)
<b>LIRIO ACONDICIONADO</b>	
Maduro (L-111109)	9.40 ± 0.10
<b>TIEMPO INICIAL</b>	
Maduro (L-111109)	7.53 ± 0.06
<b>TIEMPO FINAL</b>	
Maduro (L-111109)	10.78 ± 0.01

± Desviación estándar de los triplicados.

⊖ SÓLIDOS TOTALES

Se calculó el contenido de sólidos totales para los diferentes tiempos del tratamiento biotecnológico. Estos resultados se muestran en la tabla 7.3.2.

**Tabla 7.3.2. Resultados del análisis de sólidos totales.**

Lote	Sólidos Totales (%)
<b>LIRIO ACONDICIONADO</b>	
Maduro (L-111109)	90.60 ± 0.10
<b>TIEMPO INICIAL</b>	
Maduro (L-111109)	92.47 ± 0.06
<b>TIEMPO FINAL</b>	
Maduro (L-111109)	89.73 ± 0.88

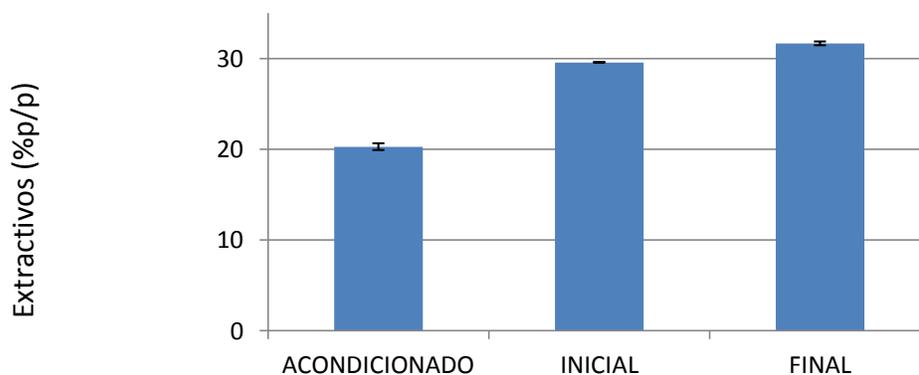
± Desviación estándar de los triplicados.

En este caso, la humedad y el contenido de sólidos totales solo nos interesan para hacer cálculos en base seca, ya que no se pretendía conservar el material, además de que fue sometido a rehidratación y secado durante y después de la fermentación.

## ⊖ EXTRACTIVOS

El contenido de extractivos se llevó a cabo por el método de Soxhlet (*Sluiter y col., 2005b*) encontrándose un aumento notable en el contenido promedio de estos después del tratamiento enzimático.

Claramente se puede ver que el contenido promedio inicial es cercano a 20 ( $\text{g}_{\text{extractivos}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ ) y aumenta en el tiempo cero debido a la composición del medio utilizado para llevar a cabo la hidrólisis enzimática y una vez terminado el proceso se obtiene un promedio en el contenido de extractivos de 31.64 ( $\text{g}_{\text{extractivos}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ ). El incremento en el contenido promedio de extractivos fue cercano al 65% (Gráf. 7.3.1). Cabe mencionar que el contenido de extractivos para el lirio "acondicionado", coincide con el contenido de extractivos encontrado para el lirio TEMA irradiado cuyos valores son de 20.26 y 24.51 ( $\text{g}_{\text{extractivos}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ ) respectivamente. Los resultados se reportan en la tabla 7.3.3.



Gráfica 7.3.1. Cambios en el contenido de extractivos debidos al tratamiento biotecnológico.

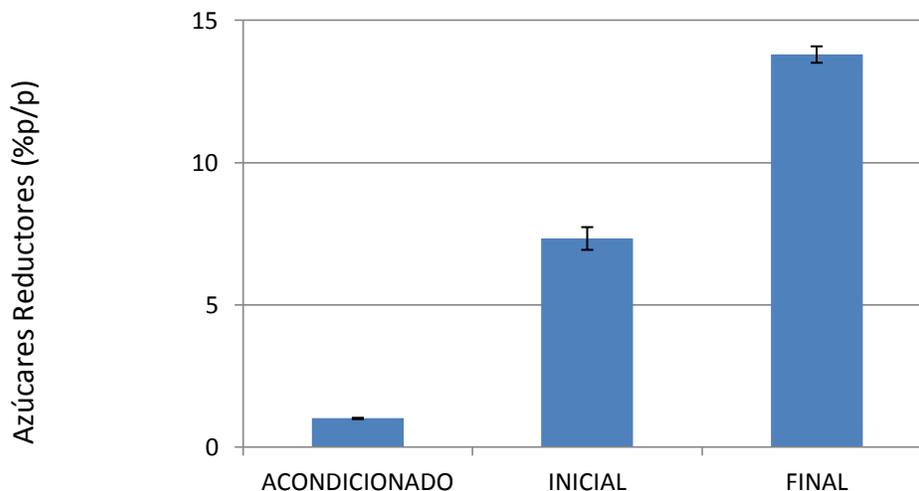
En el tiempo inicial, se presenta un aumento respecto al lirio acondicionado, debido tal vez, a que el lirio absorbe gran parte del medio de cultivo y es lo que estamos extrayendo al aplicar el método de Soxhlet. Desafortunadamente en el caso del "TIEMPO INICIAL", se contaba con muy poca muestra y por lo tanto solo se hizo un análisis, debido a ello el error y la desviación estándar no se reportan además de que se sugiere repetir estos experimentos para corroborar su certeza.

En conclusión, el contenido de extractivos aumenta conforme avanza el tiempo de fermentación. Esto es debido a la actividad enzimática del microorganismo, por lo que en algún tiempo del tratamiento el contenido de extractivos tiene que comenzar a descender debido a que el mismo microorganismo comienza a metabolizar los compuestos que se formaron en la etapa anterior.

- Azúcares reductores en el extracto acuoso

El contenido promedio de azúcares reductores en el extracto acuoso se cuantificó por el método del DNS (*Miller, 1959*). Los resultados se observan en la tabla 7.3.4 (*Véase Anexo II*).

El lirio acondicionado presentó un valor semejante en orden de magnitud al encontrado para el lirio TEMA y sus valores son 1.022 y 1.528 ( $\text{g}_{\text{Az. red}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ ) respectivamente. El aumento fue considerable, ya que el contenido de azúcares reductores en el extracto acuosos al final del tratamiento fue de casi 13 veces que al principio. También se puede ver que en el tiempo final hubo un aumento cercano al 50% ya que para el tiempo inicial se cuantificó que el contenido de azúcares reductores era de 7.34 y de 13.80 ( $\text{g}_{\text{Az. red}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ ) para el tiempo final (Gráf. 7.3.2). La diferencia en el contenido de azúcares reductores en el lirio acondicionado y el tiempo inicial, se puede explicar de igual manera a la gran capacidad que tiene esta planta de absorber sustancias, sobre todo líquidos, por lo que en este caso estamos considerando los azúcares que el lirio absorbió del medio de cultivo.



Gráfica 7.3.2. Cambios en el contenido de azúcares reductores en el extracto acuoso debidos al tratamiento biotecnológico.

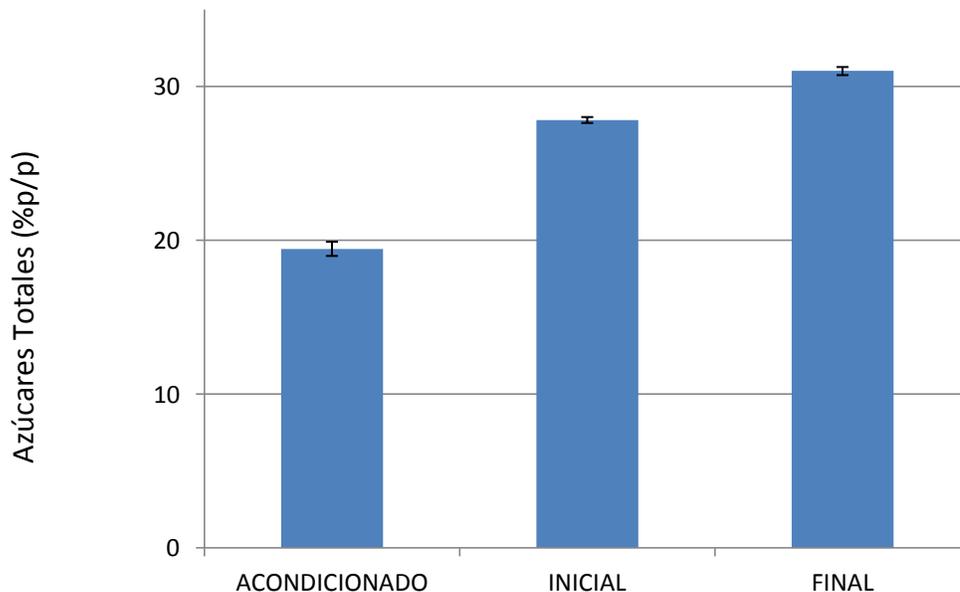
Hay un aumento en el contenido promedio de azúcares reductores en el extracto acuoso conforme transcurre el tiempo de tratamiento (Gráf. 7.3.2). Esto nos indica que el microorganismo es capaz de sintetizar las enzimas necesarias para degradar los polisacáridos estructurales. Como una de las metas futuras de este proyecto se pretende aislar y purificar dichas enzimas para caracterizarlas.

- Azúcares totales en el extracto acuoso

El contenido de azúcares totales se llevó a cabo por la técnica del fenol-sulfúrico (*Dubois y col., 1956*). La tabla 7.3.5 (*Véase Anexo II*) muestra los resultados obtenidos.

Se presentó una tendencia similar a la encontrada para los azúcares reductores. En el caso del lirio acondicionado, se obtuvo un promedio en el contenido de azúcares totales en el extracto acuoso de 19.45 ( $\text{g}_{\text{Az. totales}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ ) y aumentó hasta 31.01 ( $\text{g}_{\text{Az. totales}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ ) al tiempo final. De igual forma se presentó un aumento entre el tiempo inicial y el tiempo final de cercano al 10%, siendo sus valores medios registrados 27.83 y 31.01 ( $\text{g}_{\text{Az. totales}}/\text{100g}_{\text{Ms}}$ ) respectivamente (Gráf. 7.3.3).

Este aumento es debido a la actividad enzimática de las celulasas y hemicelulasas producidas por el microorganismo, sin embargo, al ser de solo 48h la duración del experimento el microorganismo no alcanza a consumir o a degradar los oligosacáridos que se formaron.



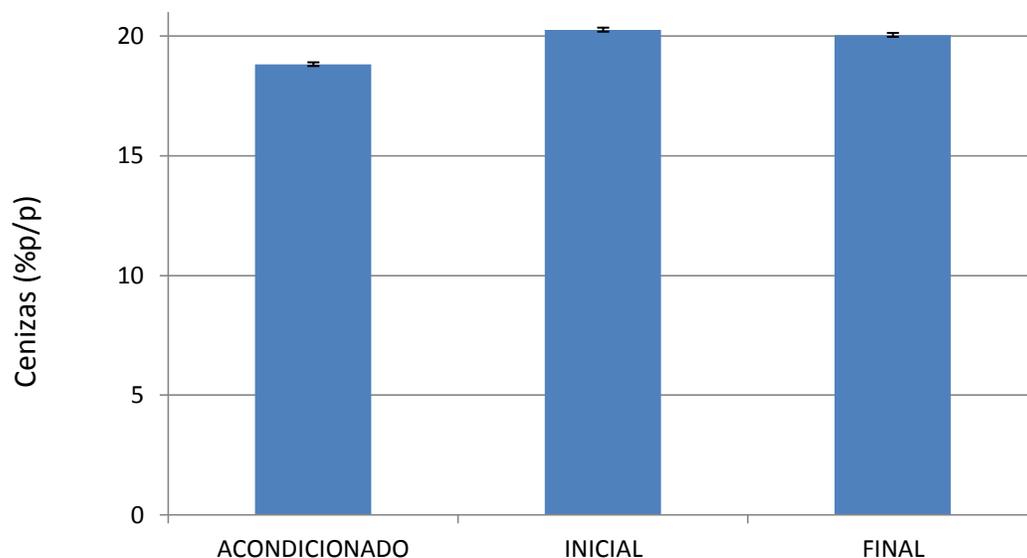
Gráfica 7.3.3. Cambios en el contenido de azúcares totales en el extracto acuoso debidos al tratamiento biotecnológico.

*Chanakya y col., 1993*, reportan una ligera disminución en el contenido de extractivos, sin embargo la duración de su experimento es de 300 días en un cultivo continuo, probablemente tiempo suficiente para que el microorganismo consuma parte de los azúcares y otros compuestos que ha liberado del lirio.

Podemos concluir, basándonos en lo que sucede con el contenido de azúcares reductores en el extracto acuoso, que se generaron las enzimas necesarias para degradar los polisacáridos estructurales del lirio acuático.

## ⊖ CENIZAS

El contenido de cenizas fue calculado por la técnica descrita por *Sluiter y col., 2005a*. Estos resultados se muestran en la tabla 7.3.6 (*Véase Anexo II*). En este caso se puede apreciar una tendencia muy particular, ya que no se presentó diferencia significativa entre las tres muestras siendo sus promedios de 18.81, 20.26 y 20.04 ( $\text{g}_{\text{cenizas}}/\text{100g}_{\text{MS}}$ ) para lirio acondicionado, al tiempo inicial y final respectivamente (Gráf. 7.3.4). Tampoco se encontraron referencias en las que describan el contenido de cenizas después de algún tratamiento biológico. También es posible observar que el resultado para el lirio tratado y el lirio TEMA presentaron un contenido de cenizas muy similar.



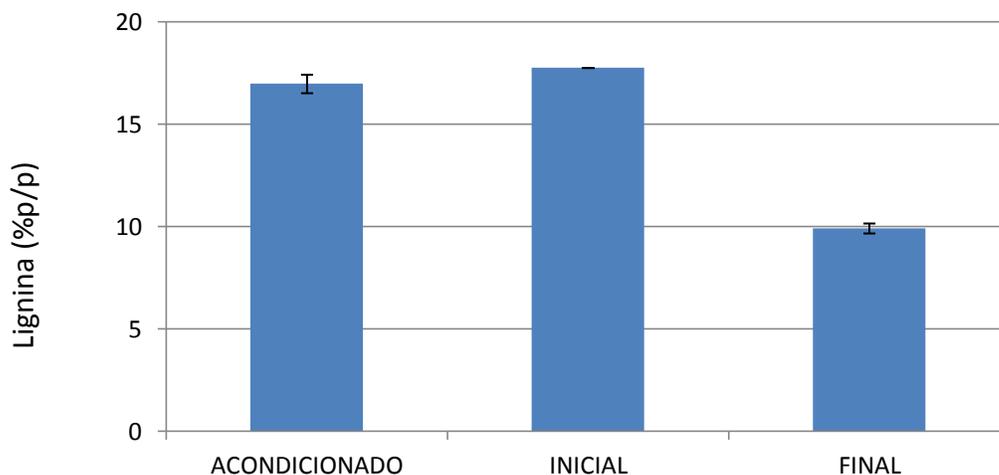
Gráfica 7.3.4. Cambios en el contenido de cenizas debidos al tratamiento biotecnológico.

En conclusión podemos decir que el tratamiento biotecnológico no afecta el contenido promedio de la parte mineral del lirio acuático. Se recomendaría evaluar qué sucede si se utiliza un medio de cultivo sin minerales para determinar si el microorganismo es capaz de asimilar el material inorgánico propio del lirio.

## ⊖ LIGNINA

En el caso de la lignina hubo una disminución casi del 40% después del tratamiento (Gráf. 7.3.5). Siendo los valores promedio registrados 17.75 y 9.91 ( $\text{g}_{\text{Lignina}}/100\text{g}_{\text{Ms}}$ ) para el tiempo inicial y final respectivamente. Los resultados se reportan en la tabla 7.3.7 (Véase el Anexo II).

De acuerdo a Chanakya y col., 1993, después del tratamiento biotecnológico se debería haber presentado un ligero aumento en el contenido promedio de lignina, sin embargo, las condiciones bajo las que operó su experimento fueron diferentes como se mencionó anteriormente, además de que en su caso utiliza bacterias metanogénicas y no hongos filamentosos pudiendo ser la razón de que los resultados comparados con los nuestro presente una tendencia contraria.

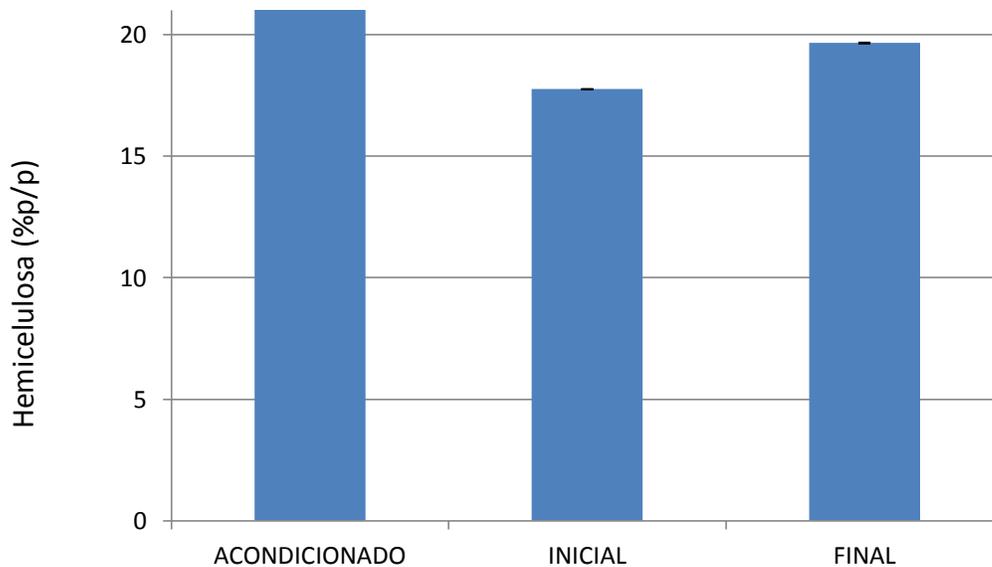


Gráfica 7.3.5. Cambios en el contenido de lignina debidos al tratamiento biotecnológico.

En conclusión. Se logró la degradación controlada de lignina a través del tratamiento biotecnológico, usando *A. niger* para este fin. Queda pendiente para un trabajo futuro aislar y caracterizar las actividades enzimáticas involucradas en este proceso.

## ⊖ HEMICELULOSA

En la tabla 7.3.8 (Véase Anexo II) se pueden observar los resultados del análisis de hemicelulosa. Hubo una ligera disminución en el contenido promedio de hemicelulosa, debido a que conforme el microorganismo crece, libera enzimas que degradan este polisacárido en sus monómeros constituyentes principales: xilosa y arabinosa, así como en arabinoxilanos y xilanos que eventualmente son consumidos como fuente de carbono por el mismo microorganismo. Como la disminución fue cercana al 8.5% respecto al contenido inicial. Los valores promedio encontrados son de 21.456 (g<sub>Hc</sub>/100g<sub>M<sub>s</sub></sub>) para el lirio acondicionado y de 19.655 (g<sub>Hc</sub>/100g<sub>M<sub>s</sub></sub>) para el lirio después de la fermentación (Gráf. 7.3.6).



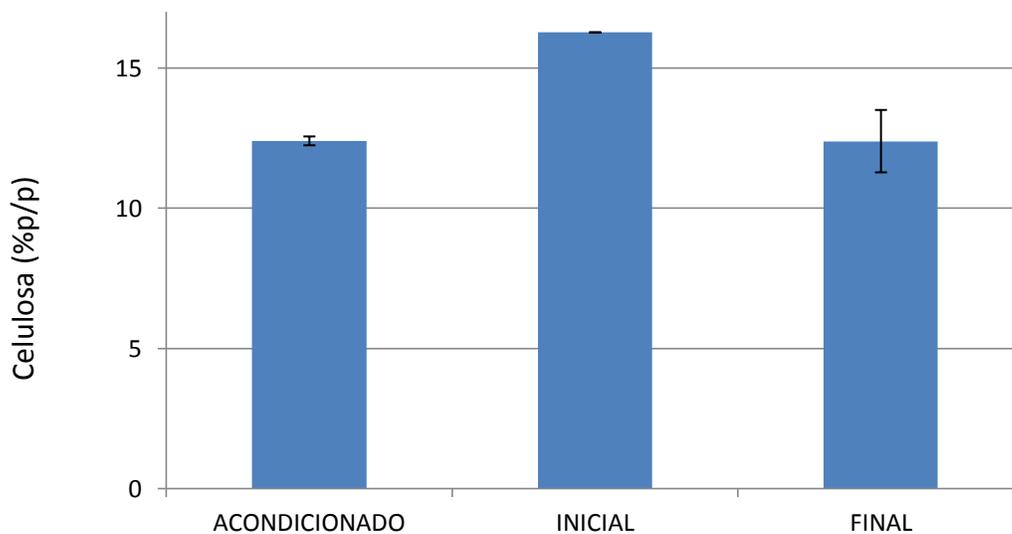
Gráfica 7.3.6. Cambios en el contenido de hemicelulosa debidos al tratamiento biotecnológico.

En el estudio de *Chanakya y col., 1993*, no se reporta el cambio en el contenido de hemicelulosa de lirio seco, sin embargo en el mismo artículo reportan que cuando someten el lirio fresco a fermentación, se presenta una disminución cercana al 1%, es decir que prácticamente no hay efecto sobre la hemicelulosa o podemos deducir que los

microorganismos implicados en esta fermentación no son capaces de sintetizar hemicelulasas endógenas ni exógenas. Esta tendencia se confirma con otro experimento pero con residuos orgánicos en donde el contenido de hemicelulosa prácticamente no sufre cambios después del tratamiento.

## ⊖ CELULOSA

No hubo cambios significativos en el contenido promedio de celulosa (Gráf. 7.3.7), siendo los valores promedio encontrados de 12.39 y 12.38 ( $g_{Cel}/100g_{Ms}$ ) para lirio acondicionado y al tiempo final. En la tabla 7.3.9 (Véase el Anexo II) se presentan los resultados del análisis de celulosa.



Gráfica 7.3.7. Cambios en el contenido de celulosa debidos al tratamiento biotecnológico.

En base a este resultado y a lo descrito por *Chanakya y col., 1993*, que reporta un aumento cercano al 30% en el contenido de celulosa, podemos intuir que el microorganismo que se utilizó para nuestra fermentación no produce celulasas o si las produce son sensibles a algún factor que aún no hemos encontrado. De igual manera,

queda pendiente evaluar con mayor detalle la actividad celulolítica del hongo para poder saber si realmente este microorganismo es productor de celulasas.

## ⊖ DISCUSIÓN GENERAL.

En base a estos resultados es que el grupo de trabajo decidirá qué etapa de madurez es la ideal para trabajar cada uno de los rubros propuesto como alternativas para encontrar compuesto de alto valor agregado a partir de lirio acuático.

En conclusión se logró transformar el lirio a través de un proceso biotecnológico controlado. Debido a las dificultades que se presentaron para obtener cantidad de muestra adecuadas se recomienda llevar a cabo de nuevo los análisis para las mismas ya que con estos datos no es suficiente para concluir y analizar a detalle los cambios que se generan por la actividad microbiabana de *R. oryzae*. En la tabla 7.3.10 se resumen las composiciones promedio determinadas para cada etapa del proceso biotecnológico.

Como consecuencia del tratamiento biotecnológico se logró un aumento en el contenido promedio de extractivos, azúcares reductores y totales. Hay una disminución en el contenido promedio de lignina y hemicelulosa y no hubo efectos sobre el contenido de cenizas y celulosa.

Se recomienda continuar con los análisis en esta sección del proyecto pero con una cantidad de muestra que sea suficiente para poder hacer los triplicados y evaluar con mayor seguridad el efecto del tratamiento con el microorganismo.

**Tabla 7.3.10. Composición promedio del lirio acuático antes y después del tratamiento.**

<b>Componente</b>	<b>ACONDICIONADO</b>	<b>TIEMPO INICIAL</b>	<b>TIEMPO FINAL</b>
Extractivos ( $g_{\text{extractivos}}/100g_{\text{Ms}}$ )	20.27 ± 0.74	29.56 ± 0	31.64 ± 0.42
Azúcares Reductores en el extracto acuoso ( $g_{\text{Az. red}}/100g_{\text{Ms}}$ )	1.02 ± 0.05	7.34 ± 0.80	13.80 ± 0.58
Azúcares Totales en el extracto acuoso ( $g_{\text{Az. totales}}/100g_{\text{Ms}}$ )	19.46 ± 0.92	27.83 ± 0.38	31.01 ± 0.53
Cenizas ( $g_{\text{cenizas}}/100g_{\text{Ms}}$ )	18.82 ± 0.16	20.26 ± 0.03	20.04 ± 0.01
Lignina ( $g_{\text{Lignina}}/100g_{\text{Ms}}$ )	16.97 ± 0.90	17.76 ± 0	9.91 ± 0.78
Hemicelulosa ( $g_{\text{Hc}}/100g_{\text{Ms}}$ )	21.46 ± 0.22	17.76 ± 0	19.66 ± 0.04
Celulosa ( $g_{\text{Cel}}/100g_{\text{Ms}}$ )	12.40 ± 0.32	16.27 ± 0	12.39 ± 2.23

± Desviación estándar de los triplicados.

## 8. CONCLUSIONES

Se logró caracterizar la composición de las fracciones de tallo y hoja del lirio acuático dependiendo de su grado de madurez.

- El contenido promedio de extractivos es siempre mayor en tallo que en hoja y mezcla tallo–hoja (TEMA) y prácticamente no cambia en la fracción tallo conforme avanza el grado de madurez mientras que en la hoja disminuye casi en un 25%.
- El contenido promedio de azúcares reductores y totales en el extracto acuoso es siempre mayor en tallo que en hoja y la mezcla tallo – hoja. Conforme la planta se desarrolla aumenta el contenido de azúcares totales y reductores en el extracto acuoso del tallo, mientras que en el extracto acuoso de la hoja el contenido de azúcares totales prácticamente no cambia y disminuye el contenido de azúcares reductores.
- El contenido de cenizas es mayor en tallo y mezcla tallo – hoja que en la fracción hoja y disminuye ligeramente conforme la planta crece tanto en tallo como en hoja.
- El mayor contenido de lignina se encuentra en la fracción hoja y conforme la planta se desarrolla se eleva el contenido promedio de esta tanto en tallo como en hoja.
- El mayor contenido de hemicelulosa está en la fracción tallo y en la mezcla tallo – hoja. Tanto en la fracción tallo como en la hoja hay un ligero aumento en el contenido de hemicelulosa conforme la planta avanza en su estado de madurez.
- El mayor contenido de celulosa está en la fracción hoja y conforme la planta se desarrolla hay una disminución en su contenido de celulosa en ambas fracciones (tallo y hoja).

Con los resultados obtenidos se podrán establecer estrategias para la utilización integral de esta planta considerada una maleza nociva. Hasta hoy y analizando los resultados obtenidos podemos darnos cuenta que en prácticamente todos los trabajos que revisamos utilizaron tallo maduro o una mezcla tallo – hoja maduros para llevar a cabo sus experimentos, por lo que es necesario conocer la composición de la planta en base a sus estado de madurez para darle un uso adecuado.

Se logró separar las fracciones A y B de la hemicelulosa del lirio y se decidió que la mejor opción es la hemicelulosa B de tallo maduro para evaluar su posible uso como fibra alimentaria y determinar su composición en cuanto contenido de xilosa, arabinosa y grado de acetilación.

Por otro lado, también se logró evaluar el efecto del crecimiento microbiano utilizando al lirio acuático como soporte en una fermentación con hongos filamentosos, sin embargo es necesario que sigan las investigaciones por esta línea que es la alternativa más viable para poder llegar a la producción de rentable de enzimas de interés industrial, etanol y biogás. Si se logra producir enzimas que degraden los polisacáridos estructurales del lirio hasta monómeros evitaríamos el uso de métodos químicos para lograr este fin.

- El contenido de extractivos aumenta conforme avanza el tiempo de fermentación. Esto es debido a la actividad enzimática del microorganismo, por lo que en algún tiempo del tratamiento el contenido de extractivos tiene que comenzar a descender debido a que el hongo comienza a metabolizar los compuestos que se formaron en la etapa anterior.
- El contenido promedio de azúcares reductores en el extracto acuoso aumenta conforme transcurre el tiempo de tratamiento lo que nos indica que el microorganismo es capaz de sintetizar las enzimas necesarias para degradar los polisacáridos estructurales.

- Basándonos en lo que sucede con el contenido de azúcares reductores en el extracto acuoso, sabemos que se generaron las enzimas necesarias para degradar los polisacáridos estructurales del lirio acuático.
- El tratamiento biotecnológico no afecta el contenido promedio de cenizas del lirio acuático. Se recomendaría evaluar qué sucede si se utiliza un medio de cultivo sin minerales para determinar si el microorganismo es capaz de asimilar el material inorgánico propio del lirio.
- Se logró la degradación controlada de lignina a través del tratamiento biotecnológico. Queda pendiente para un trabajo futuro aislar y caracterizar las actividades enzimáticas involucradas en este proceso.
- No hubo cambios significativos en el contenido promedio de celulosa, podemos intuir que el microorganismo que se utilizó para nuestra fermentación no produce celulasas o si las produce son sensibles a algún factor que aún no hemos encontrado. De igual manera, queda pendiente evaluar con mayor detalle la actividad celulolítica del hongo para poder saber si realmente este microorganismo es productor de celulasas.

Hasta hoy, la meta del proyecto en general es llegar a la producción de enzimas estables, a la producción de oligómeros de bajo peso molecular y la producción de etanol destinado como biocombustible.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abraham, M., Kurup, G.M., 1997. Pretreatment studies of cellulose wastes for optimization of cellulase enzyme activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 62, 201-211.
2. Alzamora S. M., Guerrero S. N., Nieto A. B. y Vidales S. L. 2004. *Conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas. Manual de Capacitación*. FAO. pp 2 – 5.
3. Bhattacharya A. y Kumar P. 2010. Water hyacinth as a potential biofuel crop. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 9, 112 – 122.
4. Bolenz, S., Omran, H., Gierschner, K., 1990. Treatments of Water Hyacinth Tissue to Obtain Useful Products. *Biological Wastes*, 33, 263-274.
5. (CANEI) Comité Asesor Nacional sobre especies invasoras. 2010. *Estrategia nacional sobre especies invasoras en México, prevención, control y erradicación. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad*. Comisión Nacional de Áreas Protegidas, secretaria de medio ambiente y Recursos Naturales México. pp 20 – 21.
6. Chanakya H. N., Borgaonkar S., Meena G. y Jagadish K. S. 1993. Solid-phase biogas production with garbage or water hyacinth. *Bioresource Technology*, 46, 227 – 231.
7. Charudattan R. 1997. Experience on Water hyacinth control in USA. Memoria de la reunión regional sobre control integrado de lirio acuático del 25 de noviembre de 1997, Cuernavaca, México. *Instituto Mexicano de Tecnología del Agua*. pp 45 – 49.
8. Du Toit P. J., Olivier S. P. y Van-Biljon P. L. 1984. Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates. I. Characterization of bagasse with regard to monosaccharide, hemicellulose, and amino acid composition. *Biotechnology and Bioengineering*, 26, 1071 – 1078.
9. Dubois, M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Roberts P. A. y Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350 – 356.

10. Ebringerová A., Hromádková Z., y Heinze T. 2005. Hemicellulose. *Advances in Polymer Science*, 186, 1 – 67.
11. Gakwavu R. J. 2007. Zinc and chromium removal mechanisms from industrial wastewater by using water hyacinth, *Eichhornia crassipes* (mart.) Solms. *Lambert Academic Publishing*. pp 1 – 84.
12. Girisuta, B., Danon, B., Manurung, R., Janssen, L.P.B.M., Heeres, H.J., 2008. Experimental and kinetic modelling studies on the acid-catalysed hydrolysis of the water hyacinth plant to levulinic acid. *Bioresource Technology*, 99, 8367-8375.
13. Gómez-Meléndez A., Coronado-Leza A., Landeros-Flores J. y Cárdenas-Elizondo A. 2000. Control químico y biológico del lirio acuático *Eichhornia crassipes* (mart.) solms en el río Mololoa, Nayarit, México. *Agraria*, 16, 13 – 34.
14. Goswami, T., Saikia, C.N., 1994. Water Hyacinth - a Potential Source of Raw-Material for Greaseproof Paper. *Bioresource Technology*, 50, 235-238.
15. Grootaert C., Delcour J. A., Courtin C. M., Broekaert W. F., Verstraete W. y Wiele T. V. 2007. Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 64 – 71.
16. Gunnarsson C. C. y Mattsson P. C. 2007. Water hyacinths as a resource in agriculture and energy production: A literature review. *Waste Management*, 27, 117 – 129.
17. Gutiérrez E., Ruíz E., Huerto R., Uribe E. y Martínez M. 1997. Avances y perspectivas del control de lirio acuático en México. Memoria de la reunión regional sobre control integrado de lirio acuático del 25 de noviembre de 1997, Cuernavaca, México. *Instituto Mexicano de Tecnología del Agua*. pp 23 – 30.
18. Guzmán R., Torán R., Guzmán P. y Casares R. 2006. Método simplificado para estimar la actividad del agua en deshidratación de hortalizas. *Revista de Ciencias Exactas e Ingeniería de la Universidad Nacional de Tucumán*, 27, 3 – 5.

19. Heard T. A., Winterton S. L. 2000. Interaction between nutrient status and weevil herbivory in the biological control of water hyacinth. *Journal of Applied Ecology*, 37, 117 – 127.
20. Isarankura-Na-Ayudhya C., Tantimongcolwat T., Kongpanpee T., Prabkate P. y Prachayasittikul V. 2007. Appropriate technology for bioconversion of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) to liquid ethanol: Future prospects for community strengthening and sustainable development. *Experimental and Clinical Sciences Journal*, 6, 167 – 176.
21. Juárez C. I. (2010). Evaluación del secado de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) en un secador de charolas. Tesis de licenciatura en Ingeniería Bioquímica. Instituto Politécnico Nacional – Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México.
22. Julián I., Saénz R., y Martínez S. 1999. Diccionario Oxford - Complutense de química. *Editorial Complutense*. p 66.
23. Kálmán G., Varga E., y Réczey K. 2002. Dilute sulphuric acid pretreatment of corn stover at long residence times. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 16, 151 – 157.
24. Kivaisi, A.K., Mtila, M., 1998. Production of biogas from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) (Mart) (Solms) in a two-stage bioreactor. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 14, 125-131.
25. Labrada R. 1996. Status of water hyacinth in developing countries. Strategies for water hyacinth control, report of a panel of experts meeting September 11 – 14, 1995, Fort Lauderdale, Florida USA. *FAO*. p 4 - 5.
26. Lindsey K. y Hirt H. M. 2000. "¡Usos del lirio acuático!! Un manual práctico para usos del lirio acuático alrededor del mundo". *Anamed International*. pp 2 – 4, 5 – 8, 21 – 30 y 31 – 32.
27. Ma F., Yang N., Xu C., Yu H., Wu J., y Zhang X. 2010. Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth. *Bioresource Technology*, 101, 9600 – 9604.

28. Malik A. 2007. Environmental challenge vis a vis opportunity: The case of water hyacinth. *Environment International*, 33, 122 – 138.
29. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31, 426 - 428.
30. Miranda M. G. y Lot A. H. 1999. El lirio acuático, ¿una planta nativa de México? *Ciencias*. pp 50 – 54.
31. Mishima, D., Tateda, M., Ike, M., Fujita, M. 2006. Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes. *Bioresource Technology*, 97, 2166-2172.
32. Mishima, D., Kuniki, M., Sel, K., Soda, S., Ike, M., Fujita, M., 2008. Ethanol production from candidate energy crops: Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *Bioresource Technology*, 99, 2495-2500.
33. Nabarlantz D., Farriol X. y Montané D. 2004. Kinetic modeling of autohydrolysis of lignocellulosic biomass for the production of hemicellulose derived oligosaccharides. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 43, 4124 – 4131.
34. Nigam J. N. 2002. Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. *Journal of Biotechnology*, 97, 107 – 116.
35. Patel V., Desai M. y Madamwar D. 1993. Thermochemical pretreatment of water hyacinth for improved biomethanation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 42, 67 – 74.
36. Ramos P. L. 2003. The chemistry involved in steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, 26, 863 – 871.
37. Rangel M. R. 1997. Programa de control de malezas acuáticas. Memoria de la reunión regional sobre control integrado de lirio acuático del 25 de noviembre de 1997, Cuernavaca, México. *Instituto Mexicano de Tecnología del Agua*. pp 31 – 37.
38. Rowell R. M., Pettersen R. y Han J. S., Rowell J.S. y Tshabalala M. A. 2005. Cell wall chemistry. Handbook of wood chemistry and wood composites. *CRC Press, New York*. pp 36 – 71.

39. Saldaña C. H. y Guadiana J. 1976. El lirio acuático en México, problemas y soluciones. *El Campo (México)*, 33, 3-24.
40. Sjöström, E. 1993. Wood polysaccharides. Wood chemistry, fundamentals and applications. *Academic Press, New York*. pp 71 – 88.
41. Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J. y Templeton D. 2005a. Determination of ash in biomass. Laboratory Analytical Procedure. *National Renewable Energy Laboratory*. pp 2 – 5.
42. Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J. y Templeton J. 2005b. Determination of extractives in biomass. Laboratory Analytical Procedure. *National Renewable Energy Laboratory*. pp 3 – 8.
43. Sluiter A., Hames B., Hyman D., Payne C., Ruiz E., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D. y Wolfe J. 2008. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. Laboratory Analytical Procedure. *National Renewable Energy Laboratory*. pp 2 – 5.
44. Tan L., Zhu D., Zhou Z., Mi W., Ma L. y He W. 2008. Preferring cellulose of *Eichhornia crassipes* to prepare xanthogenate to other plant materials and its adsorption properties on copper. *Bioresource Technology*, 99, 4460 – 4466.
45. Wolverton, B. C., McDonald, R. C. 1981. Energy from Vascular Plant Wastewater-Treatment Systems. *Economic Botany*, 35: 224-232.

## ANEXO I

### TABLAS DE RESULTADOS DE CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DEBIDOS AL GRADO DE MADUREZ

**Tabla 7.1.3. Resultados del análisis de extractivos.**

Lote	Extractivos (g <sub>extractivos</sub> /100g <sub>Ms</sub> )	Desviación estándar	Error (%)
<b>TEMA</b>			
Maduro (L-111109)	24.16	0.95	3.92
<b>TALLO</b>			
Joven (L-040411)	34.21	0.29	0.85
Mediano (L-130711)	35.46	1.57	4.44
Maduro (L-020211)	36.08	0.21	0.57
<b>HOJA</b>			
Joven (L-040411)	31.65	0.51	1.61
Mediano (L-130711)	34.99	1.75	5.01
Maduro (L-281010)	26.28	0.07	0.29

**Tabla 7.1.4. Resultados del análisis de azúcares reductores en el extracto acuoso.**

Lote	Azúcares Reductores (g <sub>Az. red</sub> /100g <sub>Ms</sub> )	Desviación estándar	Error (%)
<b>TEMA</b>			
Maduro (L-111109)	1.53	0.09	5.88
<b>TALLO</b>			
Joven (L-040411)	3.37	0.11	3.33
Mediano (L-130711)	0.50	0.01	1.06
Maduro (L-020211)	7.74	0.51	6.59
<b>HOJA</b>			
Joven (L-040411)	4.05	0.02	0.50
Mediano (L-130711)	0.91	0.05	5.78
Maduro (L-281010)	1.61	0.03	1.69

**Tabla 7.1.5. Resultados del análisis de azúcares totales en el extracto acuoso.**

Lote	Azúcares Totales (g <sub>Az. totales</sub> /100g <sub>Ms</sub> )	Desviación estándar	Error (%)
<b>TEMA</b>			
Maduro (L-111109)	22.48	1.43	6.38
<b>TALLO</b>			
Joven (L-040411)	18.06	0.68	3.74
Mediano (L-130711)	9.89	0.45	4.51
Maduro (L-020211)	35.73	2.96	8.28
<b>HOJA</b>			
Joven (L-040411)	16.70	0.53	3.19
Mediano (L-130711)	16.33	0.40	2.47
Maduro (L-281010)	19.94	0.65	3.24

**Tabla 7.1.6. Resultados del análisis de cenizas.**

Lote	Cenizas (g <sub>cenizas</sub> /100g <sub>Ms</sub> )	Desviación estándar	Error (%)
<b>TEMA</b>			
Maduro (L-110909)	22.11	0.74	3.34
<b>TALLO</b>			
Joven (L-040411)	21.13	0.10	0.46
Mediano (L-130711)	24.71	0.14	0.55
Maduro (L-020211)	18.08	0.10	0.54
<b>HOJA</b>			
Joven (L-040411)	13.87	0.05	0.37
Mediano (L-130711)	13.28	0.07	0.55
Maduro (L-281010)	11.46	0.08	0.72

**Tabla 7.1.7. Resultados del análisis de lignina.**

Lote	Lignina Total (g <sub>Lignina</sub> /100g <sub>MS</sub> )	Desviación estándar	Error (%)
<b>TEMA</b>			
Maduro (L-111109)	13.86	0.49	3.52
<b>TALLO</b>			
Joven (L-040411)	2.43	0.34	14.03
Mediano (L-130711)	2.52	0.49	19.64
Maduro (L-020211)	7.53	0.69	9.18
<b>HOJA</b>			
Joven (L-040411)	6.75	0.58	8.66
Mediano (L-130711)	11.28	0.58	5.16
Maduro (L-281010)	17.16	0.40	2.33

**Tabla 7.1.8. Resultados del análisis de hemicelulosa.**

Lote	Hemicelulosa Total (g <sub>Hc</sub> /100g <sub>MS</sub> )	Desviación estándar	Error (%)
<b>TEMA</b>			
Maduro (L-110909)	27.92	2.17	7.77
<b>TALLO</b>			
Joven (L-040411)	25.68	0.92	3.58
Mediano (L-130711)	25.14	0.44	1.73
Maduro (L-020211)	27.91	0.31	1.11
<b>HOJA</b>			
Joven (L-040411)	18.19	0.63	3.45
Mediano (L-130711)	24.08	1.40	5.84
Maduro (L-281010)	22.87	2.65	11.59

**Tabla 7.1.9. Resultados del análisis de celulosa.**

Lote	Celulosa Total (g <sub>Cel</sub> /100g <sub>Ms</sub> )	Desviación estándar	Error (%)
<b>TEMA</b>			
Maduro (L-110909)	8.63	0.18	2.10
<b>TALLO</b>			
Joven (L-040411)	20.93	1.55	7.41
Mediano (L-130711)	17.07	0.11	0.63
Maduro (L-020211)	14.63	0.56	3.85
<b>HOJA</b>			
Joven (L-040411)	33.56	0.76	2.25
Mediano (L-130711)	22.58	1.07	4.75
Maduro (L-281010)	19.93	0.42	2.08

## ANEXO II

TABLAS DE RESULTADOS DE CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DEBIDOS AL TRATAMIENTO BIOTECNOLÓGICO

**Tabla 7.3.3. Resultados del análisis de extractivos.**

Lote	Extractivos (g <sub>extractivos</sub> /100g <sub>Ms</sub> )	Desviación estándar	Error (%)
<b>LIRIO ACONDICIONADO</b>			
Maduro (L-111109)	20.27	0.74	3.67
<b>TIEMPO INICIAL</b>			
Maduro (L-111109)	29.56	S.D. <sup>1</sup> .	S.D. <sup>1</sup> .
<b>TIEMPO FINAL</b>			
Maduro (L-111109)	31.64	0.42	1.32

<sup>1</sup>S.D. Sin duplicado

**Tabla 7.3.4. Resultados del análisis de azúcares reductores en el extracto acuoso.**

Lote	Azúcares Reductores (g <sub>Az. red</sub> /100g <sub>Ms</sub> )	Desviación estándar	Error (%)
<b>LIRIO ACONDICIONADO</b>			
Maduro (L-111109)	1.02	0.05	4.55
<b>TIEMPO INICIAL</b>			
Maduro (L-111109)	7.34	0.80	10.86
<b>TIEMPO FINAL</b>			
Maduro (L-111109)	13.80	0.58	4.19

**Tabla 7.3.5. Resultados del análisis de azúcares totales en el extracto acuoso.**

Lote	Azúcares Reductores (g <sub>Az. totales</sub> /100g <sub>Ms</sub> )	Desviación estándar	Error (%)
<b>LIRIO ACONDICIONADO</b>			
Maduro (L-111109)	19.46	0.92	4.73
<b>TIEMPO INICIAL</b>			
Maduro (L-111109)	27.83	0.38	1.38
<b>TIEMPO FINAL</b>			
Maduro (L-111109)	31.01	0.53	1.70

**Tabla 7.3.6. Resultados del análisis de cenizas.**

Lote	Cenizas (g <sub>cenizas</sub> /100g <sub>Ms</sub> )	Desviación estándar	Error (%)
<b>LIRIO ACONDICIONADO</b>			
Maduro (L-111109)	18.82	0.16	0.82
<b>TIEMPO INICIAL</b>			
Maduro (L-111109)	20.26	0.03	0.13
<b>TIEMPO FINAL</b>			
Maduro (L-111109)	20.04	0.01	0.06

**Tabla 7.3.7. Resultados del análisis de lignina.**

Lote	Lignina (g <sub>Lignina</sub> /100g <sub>Ms</sub> )	Desviación estándar	Error (%)
<b>LIRIO ACONDICIONADO</b>			
Maduro (L-111109)	16.97	0.90	5.33
<b>TIEMPO INICIAL</b>			
Maduro (L-111109)	17.76	S.D <sup>1</sup> .	S.D <sup>1</sup> .
<b>TIEMPO FINAL</b>			
Maduro (L-111109)	9.91	0.78	4.92

<sup>1</sup>S.D. Sin duplicado

**Tabla 7.3.8. Resultados del análisis de hemicelulosa.**

Lote	Hemicelulosa (g <sub>Hc</sub> /100g <sub>Ms</sub> )	Desviación estándar	Error (%)
<b>LIRIO ACONDICIONADO</b>			
Maduro (L-111109)	21.46	0.22	1.00
<b>TIEMPO INICIAL</b>			
Maduro (L-111109)	17.76	S.D <sup>1</sup> .	S.D <sup>1</sup> .
<b>TIEMPO FINAL</b>			
Maduro (L-111109)	19.66	0.04	0.19

<sup>1</sup>S.D. Sin duplicado

**Tabla 7.3.9. Resultados del análisis de celulosa.**

Lote	Celulosa (g <sub>Cel</sub> /100g <sub>Ms</sub> )	Desviación estándar	Error (%)
<b>LIRIO ACONDICIONADO</b>			
Maduro (L-111109)	12.40	0.32	2.55
<b>TIEMPO INICIAL</b>			
Maduro (L-111109)	16.27	S.D <sup>1</sup> .	S.D <sup>1</sup> .
<b>TIEMPO FINAL</b>			
Maduro (L-111109)	12.39	2.23	17.96

<sup>1</sup>S.D. Sin duplicado

## ANEXO III

Métodos de análisis.

- Determinación de humedad y sólidos totales.

Determinación de humedad por termobalanza:

- a) Revisar el estado del equipo, poniendo mucha atención en la nivelación.
- b) Encender el equipo.
- c) Seleccionar el programa adecuado, para nuestro caso, T = 100°C y hasta alcanzar peso constante.
- d) Colocar el platillo vacío en el soporte y presionar el botón de "TARA".
- e) Cuando el equipo marque ceros, colocar aproximadamente 0.5g (entre 0.5 y 1g) de muestra, cerrar el compartimiento y presionar el botón de inicio ("STAR").
- f) Registrar el % de humedad que aparece en pantalla.
- g) Presionar el botón de "TARA", retirar el platillo, limpiar y apagar el equipo.
- h) Hacer el ensayo por triplicado.

Determinación de sólidos totales por diferencia:

- a) Utilizar la siguiente expresión matemática para calcular el contenido de sólidos totales de cada muestra, por triplicado cómo mínimo:

$$\%S.T. = 100 - \%Humedad$$

- Determinación de cenizas por calcinación en mufla..
  - a) Colocar los crisoles en una estufa a 105°C por 12h, sacar de la estufa permitir que se enfríen y pesar.
  - b) Colocar de 1 a 2g de muestra en el crisol. Hacer el análisis por triplicado.

- c) Colocar el crisol en la mufla a 525°C por 4h.
- d) Transcurrido este tiempo sacar el crisol y colocarlo en un desecador hasta que alcance temperatura ambiente.
- e) Colocar el crisol en la mufla a 525°C por 2h.
- f) Sacar, permitir que se enfríe y pesar.
- g) Repetir el procedimiento hasta alcanzar peso constante.

Aplicar la siguiente expresión matemática para calcular el contenido de cenizas:

$$\text{Contenido de cenizas} = \frac{W_{\text{cenizas}}}{M_i} * 100$$

Donde  $W_{\text{cenizas}}$  es el peso de las cenizas y  $M_i$  es la materia seca de la muestra inicial, la cual se calcula multiplicando el peso de la muestra inicial por el contenido de sólidos totales y dividido entre 100.

- Determinación de extractivos por método de Soxhlet.
  - a) Secar los cartuchos de celulosa junto con sus tapones de algodón a 105°C hasta que alcancen peso constante.
  - b) Pesar cada cartucho con su tapón de algodón y registrar los pesos ( $C_{SV}$ ).
  - c) Colocar en cada cartucho de 2 – 4g de muestra. Pesar cada cartucho con muestra y tapón de algodón y registrar los pesos ( $C_{SM}$ ).
  - d) Colocar cada cartucho en una columna de extracción Soxhlet.
  - e) Armar el dispositivo de extracción Soxhlet (Columna de extracción, condensador, matraz recolector y mantilla de calentamiento).
  - f) En cada matraz recolector adicionar 150mL de agua grado "millipore" y 5 o 6 perlas de ebullición. Colocar el matraz en el dispositivo.
  - g) Encender la bomba de recirculación de refrigerante y permitir que baje la temperatura del anticongelante a 5 – 8°C.
  - h) Encender el las mantillas e iniciar el calentamiento de manera paulatina hasta que el disolvente comience hervir.

- i) Controlar el calentamiento de manera que se alcancen de 4 – 5 reflujos por hora.
- j) Permitir el reflujo hasta que el disolvente ya no salga colorido (8 – 12h aprox.).
- k) Apagar las mantillas de calentamiento, permitir que el dispositivo se enfríe a temperatura ambiente y recuperar el contenido del matraz recolector en una probeta ( $V_{EA}$ ).
- l) Adicionar 150 mL de alcohol étílico absoluto anhidro en cada matraz recolector.
- m) Encender el las mantillas e iniciar el calentamiento de manera paulatina hasta que el disolvente comience hervir.
- n) Controlar el calentamiento de manera que se alcancen de 6 – 8 reflujos por hora.
- o) Permitir el reflujo hasta que el disolvente ya no salga colorido (8 – 12h aprox.).
- p) Apagar las mantillas de calentamiento, permitir que el dispositivo se enfríe a temperatura ambiente y recuperar el contenido del matraz recolector en una probeta ( $V_{EE}$ ) y el cartucho en un vaso de precipitados.
- q) Colocar los cartuchos en un horno de sacado a 60°C por 12h.
- r) Pesar cada uno de los cartuchos, volver a colocarlos en el horno a 60°C y repetir el procedimiento hasta alcanzar peso constante. Registrar el peso de cada cartucho con muestra libre de extractivos ( $C_{MLE}$ ).
- s) Hacer el análisis por triplicado.

Utilizar la siguiente expresión matemática para calcular el contenido de extractivos:

$$\%E = \left(1 - \frac{MLE}{M_s}\right) * 100$$

En donde **MLE** es la materia libre de extractivos y **M<sub>s</sub>** es la materia seca inicial calculada de la misma forma que para el caso de las cenizas.

- Determinación de azúcares reductores por el método del DNS.
  - a) Preparar una solución estándar de algún azúcar reductor (Glucosa, Xylosa) de concentración conocida (1 - 2g/L).
  - b) En 5 tubos de ensayo hacer diluciones para obtener concentraciones de 1 hasta 0.0625g/L y en otros dos tubos colocar 1mL de agua destilada por triplicado.
  - c) Adicionar a cada uno de los 7 tubos 1.5mL de reactivo DNS.
  - d) En tubos de ensayo colocar 1mL de extracto acuoso recuperado del método Soxhlet de cada muestra (por triplicado).
  - e) Adicionar 1.5mL de reactivo DNS a cada tubo.
  - f) Calentar todos los tubos a baño María (agua a 92°C) durante 10 minutos.
  - g) Retirar del baño María y enfriar.
  - h) Leer absorbancia en espectrofotómetro a 640nm, ajustando a cero con un blanco de agua destilada y DNS.
  - i) Registrar los datos.

Utilizar la siguiente expresión matemática para calcular el contenido de azúcares reductores:

$$\%A.R. = \frac{(A_{640} \pm O_o) * Dil * Vol.rec * 100}{m * M_s}$$

En donde  $A_{640}$  es la lectura registrada en el espectrofotómetro para cada muestra, la  $O_o$  y  $m$  son la ordenada al origen y la pendiente de la curva tipo,  $Dil$  es la dilución,  $Vol.rec.$  es el volumen recuperado y  $M_s$  es la materia seca inicial.

- Determinación de azúcares totales por el método del fenol - sulfúrico.
  - a) Preparar una solución de fenol en ácido sulfúrico concentrado con concentración de 1mg/mL (preparar al momento de hacer el análisis).

- b) Preparar una solución estándar de algún azúcar (Xylosa) de concentración conocida (1 - 2g/L).
- c) En 4 tubos de ensayo hacer diluciones para obtener concentraciones de 0.5 hasta 0.0625g/L y en otros dos tubos colocar 1mL de agua destilada (por triplicado).
- d) Colocar en tubos de ensayo 1mL de extracto acuoso (hacer la dilución correspondiente en caso de ser necesario y el análisis debe hacerse por triplicado).
- e) Colocar todos los tubos en baño de hielo durante 15 minutos.
- f) Inclinar los tubos a 45° dentro del baño de hielo.
- g) De manera muy lenta pero constante, adicionar 2mL de la solución fenol – sulfúrico a cada tubo.
- h) Agitar cada tubo sin sacarlo del baño de hielo.
- i) Colocar todos los tubos en baño maría (agua a 92°C) durante 10 minutos.
- j) Transcurrido este tiempo, enfriar los tubos en el baño de hielo.
- k) Leer absorbancia en espectrofotómetro a 480nm, ajustando a cero con un blanco de agua y ácido sulfúrico.
- l) Registrar los datos.

Utilizar la siguiente expresión matemática para calcular el contenido de azúcares totales:

$$\%A. T. = \frac{(A_{480} \pm O_o) * Dil * Vol.rec * 100}{m * M_s}$$

En donde **A<sub>480</sub>** es la lectura registrada en el espectrofotómetro para cada muestra, la **O<sub>o</sub>** y **m** son la ordenada al origen y la pendiente de la curva tipo, **Dil** es la dilución, **Vol.rec.** es el volumen recuperado y **M<sub>s</sub>** es la materia seca inicial.

- Tratamiento termoquímico.
  - a) Pesar con exactitud aproximadamente 5g de muestra seca en un frasco de vidrio de boca ancha con tapa hermética (por triplicado).

- b) Adicionar 95mL de solución de ácido sulfúrico al 1.5%v/v y mantener en agitación por 24h a 150rpm.
- c) Transcurrido este tiempo colocar el frasco en una autoclave y someterlo a tratamiento térmico de 15lbs, 118°C por 30 minutos.
- d) Despresurizar la autoclave en menos de 1 minuto, abriendo la válvula con cuidado para no sufrir quemaduras.
- e) Sacar el frasco y permitir que se enfríe un poco abriendo la tapa.
- f) Filtrar sobre papel filtro de poro medio (seco y tarado).
- g) Recuperar el filtrado (líquido) y medir el volumen obtenido.
- h) Colocar el papel filtro con residuo en una estufa a 105°C, hasta alcanzar peso constante.

Determinación de lignina soluble en ácido (Klason) por UV.

- a) Preparar una solución estándar de lignina de concentración conocida (2g/L).
- b) Hacer diluciones hasta 0.0625(g/L).
- c) Tomar 1mL del filtrado obtenido por ME – 06 y hacer diluciones hasta 1:1000.
- d) Leer absorbancia en espectrofotómetro a 280nm, ajustando a cero con sol. de ácido sulfúrico 1.5%v/v y utilizando la celda adecuada (cuarzo). Hacer el análisis por triplicado.

Utilizar la siguiente expresión matemática para calcular el peso de lignina soluble en ácido recuperada:

$$W_{L.K.} = \frac{(A_{280} \pm O_o) * Dil * Vol. rec}{m}$$

En donde **A<sub>280</sub>** es la lectura registrada en el espectrofotómetro para cada muestra, la **O<sub>o</sub>** y **m** son la ordenada al origen y la pendiente de la curva tipo, **Dil** es la dilución y **Vol.rec.** es el volumen recuperado del tratamiento termoquímico.

### Determinación de monómeros por HPLC.

- a) Preparar soluciones estándar de glucosa, xilosa, arabinosa, ácido acético, furfural y 5-HMF de concentración conocida (2g/L).
- b) Hacer diluciones hasta 0.0625(g/L) y filtrar sobre membranas de 0.22µm para HPLC.
- c) Tomar una alícuota de 500µL del filtrado obtenido en ME – 06 y filtrarlo a través de una membrana de 0.22µm, para HPLC.
- d) Inyectar 20µL de muestra en un equipo HPLC con columna para análisis de ácidos orgánicos (Biorad). Solución de ácido sulfúrico 5mM como fase móvil, a razón de flujo de 0.6mL/min, presión de 60bar y temperatura de 65°C, acoplado a un detector primario de índice de refracción y un detector secundario de espectro ultravioleta ajustado a 210nm.
- e) Obtener los cromatogramas e integrar de forma manual los picos de interés (glucosa 9.5min., xilosa 10.14min., arabinosa 11.06min., y ácido acético 16.38min., en el cromatograma IR y 5-HMF 37.17min., y furfural 54.57 min., en el cromatograma UV). Hacer el análisis por duplicado.

Utilizar la siguiente expresión matemática para calcular el peso recuperado de xilanos, monómeros (glucosa, xilosa y arabinosa) e inhibidores:

$$W_i = \frac{(A_i \pm O_o) * Vol.rec}{m}$$

En donde **A<sub>i</sub>** es el área registrada en el cromatograma para cada muestra, la **O<sub>o</sub>** y **m** son la ordenada al origen y la pendiente de la curva tipo, **Vol.rec.** es el volumen recuperado del tratamiento termoquímico.

- Tratamiento alcalino – peróxido.
  - a) Preparar una solución de Hidróxido de sodio 2M (o de concentración conocida).
  - b) A partir de la solución anterior preparar una solución de 2.25% de hidróxido de sodio, y 0.75% de peróxido de hidrógeno (preparar al momento de utilizar).
  - c) En un matraz Erlenmeyer, pesar la materia no degradada obtenida del tratamiento termoquímico y adicionar 15mL de la solución peróxido alcalino por cada gramo.
  - d) Mantener en agitación (150rpm) a 55°C durante 1h.
  - e) Filtrar. El residuo sólido se seca a 105°C por 24h hasta alcanzar peso constante.
  - f) El filtrado recuperado se acidifica con una solución de ácido acético 50% (v/v) hasta pH 4 – 5, manteniendo en agitación durante 10 – 15 minutos hasta que se estabilice el precipitado que se forma (lignina alcalina).
  - g) Verter en tubos o botes para centrifuga tarados, recuperando totalmente el precipitado formado y centrifugar a 3800rpm durante 20minutos y temperatura ambiente.
  - h) Decantar el sobrenadante y poner a secar los tubos o botes de centrifuga con el residuo sólido (lignina alcalina) a 85°C durante 24h hasta peso constante.
  - i) El sobrenadante recuperado se vierte gota a gota sobre alcohol etílico absoluto (99.99%) en una proporción de volumen 3:1, manteniendo en agitación hasta que se estabilice el precipitado que se forma (Hemicelulosa B).
  - j) Verter en tubos o botes para centrifuga tarados, recuperando totalmente el precipitado formado y centrifugar a 3800rpm durante 20minutos y temperatura ambiente.
  - k) Decantar el sobrenadante y poner a secar los tubos o botes de centrifuga con el residuo sólido (Hemicelulosa B) a 85°C durante 24h hasta peso constante.

Utilizar las siguientes expresiones matemáticas para calcular los contenidos de:

Lignina:

$$W_{L.T.} = W_{L.A.} + W_{L.K.}$$

En donde  $W_{L.T.}$  es el peso total de lignina recuperada,  $W_{L.A.}$  es el peso de la lignina alcalina recuperada del tratamiento alcalino – peróxido y  $W_{L.K.}$  es el peso de la lignina Klason recuperada en el tratamiento termoquímico.

El contenido de lignina se calcula de la siguiente manera:

$$\%Lignina = \frac{W_{L.T.}}{M_s} * 100$$

En donde  $M_s$  es la materia seca inicial.

Hemicelulosa:

$$W_{HcA} = W_{M.D.} - (W_E + W_{L.K.} + W_{Glc} + W_{5-HMF})$$

En donde  $W_{HcA}$  es el peso de hemicelulosa A,  $W_E$  es el peso de los extractivos recuperados del método Soxhlet,  $W_{M.D.}$  es el peso de materia degradada,  $W_{L.K.}$  es el peso de la lignina Klason,  $W_{Glc}$  es el peso de la glucosa y  $W_{5-HMF}$  es el peso del 5-HMF recuperados del tratamiento termoquímico.

$$W_{HcT} = W_{HcA} + W_{HcB}$$

En donde  $W_{HcT}$  es el peso de hemicelulosa total recuperada y  $W_{HcB}$  es el peso de la hemicelulosa B recuperada del tratamiento alcalino – peróxido.

El contenido de hemicelulosa se calcula de la siguiente manera:

$$\%Hemicelulosa = \frac{W_{HcT}}{M_s} * 100$$

En donde  $M_s$  es la materia seca inicial.

Celulosa:

$$W_{C.D.} = W_{Glc} + W_{5-HMF}$$

En donde  $W_{C.D.}$  es el peso de la celulosa degradada en el tratamiento termoquímico.

$$W_{C.R.} = W_{M.N.D.} - (W_{cenizas} + W_{L.A.} + W_{HCB})$$

En donde  $W_{C.R.}$  es el peso de la celulosa recuperada del tratamiento alcalino – peróxido y  $W_{M.N.D.}$  es la materia no degradada del tratamiento termoquímico.

$$W_{C.T.} = W_{C.D.} + W_{C.R.}$$

En donde  $W_{C.T.}$  es el peso de la celulosa total.

El contenido de Celulosa se calcula de la siguiente manera:

$$\%Celulosa = \frac{W_{C.T.}}{M_s} * 100$$

En donde  $M_s$  es la materia seca inicial.

Las desviaciones estándar se calculan con la siguiente fórmula:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_1^n (X_i - X_m)^2}{n}}$$

En donde  $X_i$  es el valor observado,  $X_m$  el promedio y  $n$  el número de repeticiones.