



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“APROVECHAMIENTO INTEGRAL DEL LIMÓN RESIDUAL
PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL”**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO QUÍMICO**

**P R E S E N T A:
P.I.Q. FLORENTINO CORTÉS VELÁSQUEZ**

**ASESOR:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
JAIME SAUCEDO LUNA**

MORELIA MICH, NOVIEMBRE DEL 2014





FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

PROGRAMA ACREDITADO

Número de oficio. 143/2013/2014.

P.I.Q. Florentino Cortes Velásquez
P r e s e n t e.

En contestación a su atenta solicitud de fecha de 25 de octubre de 2013 me permito comunicarle a Usted, que se aprueba el Tema de Tesis propuesto para presentar Examen Recepcional en la Carrera de Ingeniero Químico.

El tema aprobado: "Aprovechamiento Integral del Limón Residual para la Obtención de Bioetanol" el cual se desarrollará bajo el siguiente orden:

- RESUMEN
- I.- INTRODUCCIÓN (JUSTIFICACIÓN, OBJETIVO (S) E HIPÓTESIS)
 - II.- GENERALIDADES O MARCO TEÓRICO
 - III.- DESARROLLO DEL TRABAJO (METODOLOGÍA)
 - IV.- ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS
 - V.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES
- REFERENCIAS.

Además deberá de ajustarse al artículo 39 y 41, y podrá contemplar los puntos necesarios del artículo 40 de la reglamentación interna de la Facultad de Ingeniería Química en su capítulo VI.

Para tales efectos fungirá como asesor de su Tesis el Dr. Jaime Saucedo Luna Profesor Investigador de la Facultad de Ingeniería Química.

DR. SAUCEDO LUNA JAIME	PRESIDENTE	89000498
DR. CASTRO MONTOYA AGUSTÍN JAIME	VOCAL	01000179
M. EN A. MARTÍNEZ HERNÁNDEZ MARÍA GUADALUPE	VOCAL	87002477
M.C. REYES REYES MARÍA TERESA	SUPLENTE	05005493

A T E N T A M E N T E

Morelia, Mich. 15 de Noviembre de 2013.

DR. JAIME ESPINO VALENCIA
DIRECTOR
DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



Edificio "M" Planta Baja
Ciudad Universitaria

Tel/Fax 3-16-71-76
3-22-35-00 Ext. 3003



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

PROGRAMA ACREDITADO

"2014, Año de Octavio Paz"

No. Oficio 73/2014/2015.

LIC. ULISES GUTIÉRREZ VÁZQUEZ
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN
DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA
P R E S E N T E.

Por medio de la presente, me estoy permitiendo transcribir a esa Sección de Certificación a su digno cargo la comunicación enviada a esta Dirección por la mesa de jurado de Examen Recepcional de esta fecha y que a la letra dice:

Atendiendo a las indicaciones se hizo la revisión de manuscrito de tema de TESIS presentado por el pasante de Ingeniero Químico: FLORENTINO CORTES VELÁSQUEZ

Creemos que es de aceptarse dicho manuscrito con las modificaciones sugeridas verbalmente al interesado: ENTERADOS:

DR. SAUCEDO LUNA JAIME
DR. CASTRO MONTOYA AGUSTÍN JAIME
M. en A. MARTÍNEZ HERNÁNDEZ MARÍA GUADALUPE
M.C. REYES REYES MARÍA TERESA

PRESIDENTE 89000498
VOCAL 01000179
VOCAL 87002477
SUPLENTE 05005493

Comunico a usted lo anterior para los fines legales a que haya lugar.

ATENTAMENTE
Morelia, Mich. A 28 de octubre de 2014

DR. JAIME ESPINO VALENCIA
DIRECTOR
DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



C.c.p. Archivo

Edificio "M" Planta Baja
Ciudad Universitaria

Tel/Fax 3-16-71-76
3-22-35-00 Ext. 3003



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

PROGRAMA ACREDITADO

"2014, Año de Octavo Paz"

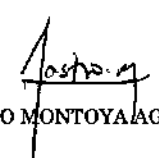
Morelia, Mich. A 27 de octubre de 2014.

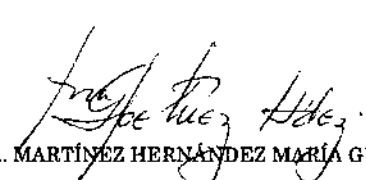
DR. JAIME ESPINO VALENCIA
DIRECTOR
DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
PRESENTE

Atendiendo a sus indicaciones se hizo la revisión de manuscrito de TESIS presentada por el P.I.Q. FLORENTINO CORTES VELÁSQUEZ.

Creemos que es de aceptarse dicho manuscrito con las modificaciones sugeridas verbalmente al interesado.


DR. SAUCEDO LUNA JAIME
PRESIDENTE


DR. CASTRO MONTOYA AGUSTÍN JAIME
VOCAL


M. EN A. MARTÍNEZ HERNÁNDEZ MARÍA GUADALUPE
VOCAL C.c.p. Archivo



Edificio "M" Planta Baja
Ciudad Universitaria

Tel/Fax 3-16-71-76
3-22-35-00 Ext. 3003

DIOS, PON TU MANO SOBRE MÍ...

*Dedicado a mis padres Guislermo Cortés y Cecilia Velázquez,
Virginia Solórzano, Hermanos y Amigos.*

Agradezco y Dedico a:

Creo que es un tanto complicado poder describir los sentimientos de inmensa alegría que me invaden en este momento que escribo esta dedicatoria y agradecimiento. Volteo hacia atrás para ver y pensar en todas esas personas que hasta ahora han estado en mi vida, me han ayudado y han formado parte de ella. Hoy unas de estas personas están aquí conmigo, otras están en mis recuerdos y algunas en mi corazón.

Agradezco...

Primero a Dios, por darme la oportunidad de vivir, de acompañarme todos los días y guiarme en mi camino y llenarme de bendiciones y alegrías.

A mis padres por todo ese inmenso amor, cariño y respeto; por ese gran esfuerzo de toda una vida de arduo trabajo, sacrificios, preocupaciones, para ayudarme a forjar mi camino, cumplir con mis metas, objetivos y ser una mejor persona. Muchas gracias.

Papá, este logro lo comparto contigo, gracias por creer en mí, por todas las cosas que nos has dado, escuelas, comida, por todos los consejos y apoyo. Sobre todo por tu amor. Te quiero mucho.

A mi mamá, la mejor del mundo!!!, por todo ese esfuerzo para sacarnos adelante, todas esas desveladas y tardes que pasabas conmigo, por la educación que me diste en nuestro hogar, por ese gran amor, amistad, compañía. Te adoro.

A mis hermanos por ser parte importante de mi vida y representar la unidad familiar, crecer junto con ustedes ha sido una aventura, momentos increíbles e inolvidables, recuerdos que me llenan de felicidad, muchas gracias por estar conmigo por llenar mi vida de alegrías y amor cuando más lo he necesitado. Los quiero mucho!!!.

A Virginia, por todo tu gran amor y cariño igual al de una mamá para mí, por todo tu apoyo incondicional, tus grandes consejos y toda esa inmensa bondad que existe en ti. Muchas gracias por todo lo que haces por mí.

A Diana, por todo el apoyo brindado y animarme, por aguantarme y siempre busca la manera de tenerme de buenas, eres muy especial TKM.

A mis amigos, Carlos, Yey, Naye, Katy, Angie, May, que están en las buenas y en las malas que me aconsejan y me divierten con ustedes y hacen la vida más amena. Que nuestros caminos se cruzaron para que con toda la buena voluntad y disposición trabajáramos en conjunto para culminar con este gran paso para que nuestro sueño ahora sea una realidad.

A mis maestros, Dr. Jaime Saucedo Luna por todo el apoyo brindado para la realización de esta tesis, por su tiempo, confianza, porque formó parte importante en mi formación académica, a la M. en A. María Guadalupe Martínez Hernández y el Dr. Agustín Jaime Castro Montoya por su tiempo dedicado a este trabajo y por sus enseñanzas en los salones de clases, de igual manera a todos los maestros que a lo largo de mi vida me han aportado un conocimiento, me han hecho madurar y crecer como persona.

A la todas las personas que han sido importantes en la realización de este trabajo, en especial a Sergio Francisco por su apoyo y dedicación en el laboratorio, se volvió antisocial en esos momentos, a Erik y Ulises por sus consejos y su buena voluntad.

Los pequeños actos que se ejecutan son mejores
que todos aquellos grandes que se planean.

(George E. Marshall)

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
RESUMEN.....	XIV
ABSTRACT	XV
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.1 JUSTIFICACIÓN	3
1.1.2 HIPÓTESIS	3
1.1.3 OBJETIVOS	4
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
1.2 ANTECEDENTES	5
1.3 HISTORIA DEL LIMÓN.....	5
1.3.1 FRUTOS CÍTRICOS	6
1.3.2 MORFOLOGÍA DE CÍTRICOS.....	6
1.4 LIMONES.....	8
CARACTERÍSTICAS DEL LIMÓN MEXICANO	10
1.4.1 PRODUCCIÓN DE LIMÓN EN MÉXICO	11
1.5 ACEITES ESENCIALES.....	14
1.6 COMPUESTOS FENÓLICOS Y FLAVONOIDES.....	15
1.6.1 BIOSÍNTESIS DE LOS FLAVONOIDES	19
1.6.2 HESPERIDINA.....	20
1.6.3 ERIOCITRINA.....	21
1.6.4 DIOSMINA.....	22
1.7 CARBOHIDRATOS	22
1.8 ALMIDÓN.....	23
1.9 POLISACÁRIDOS	23
1.9.1 CELULOSA	23
1.9.2 HEMICELUSOSA	24
1.9.3 LIGNINA.....	26
1.10 TRATAMIENTO PARA LA SEPARACIÓN DE BIOMASA	29

1.10.1	HIDRÓLISIS ÁCIDA.....	29
1.10.2	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	29
1.11	BIOCOMBUSTIBLES.....	30
1.11.1	BIOCOMBUSTIBLES DE PRIMERA GENERACIÓN	31
1.11.2	BIOCOMBUSTIBLES DE SEGUNDA GENERACIÓN.....	32
1.11.3	BIOCOMBUSTIBLES DE TERCERA GENERACIÓN.....	32
2	MATERIAL Y MÉTODOS	33
2.1.1	MATERIA PRIMA	33
2.1.2	MÉTODOS	33
2.2	DIAGRAMA GENERAL DEL PROCESO.....	34
2.3	DETERMINACIÓN DE HUMEDAD.....	35
2.3.1	MÉTODO, PÉRDIDA DE PESO POR ESTUFA.....	35
2.4	ACEITE ESENCIAL.....	37
2.5	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PARA FENOLES Y FLAVONOIDES.	38
2.5.1	MÉTODO DE MACERACIÓN	38
2.5.2	CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR EL MÉTODO COLORIMÉTRICO DE FOLIN CIOCALTEU	39
2.5.3	DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES	40
2.5.4	DISEÑO EXPERIMENTAL PARA COMPUESTOS FENÓLICOS Y FLAVONOIDES TOTALES	42
2.6	SACARIFICACIÓN DEL RESIDUO.....	42
2.6.1	SACARIFICACIÓN DEL LIMÓN	43
2.6.2	HIDRÓLISIS ÁCIDA.....	44
2.6.3	DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES	45
2.6.4	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	45
2.6.5	ANÁLISIS Y PREPARACIÓN DE HIDROLIZADOS	46
2.7	DETERMINACIÓN DE LA LIGNINA.....	47
3	RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	48
	MATERIA PRIMA	48
3.1	HUMEDAD.....	48
3.2	ACEITE ESENCIAL.....	49
3.3	CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES Y FLAVONOIDES TOTALES.....	50

3.3.1 DISEÑO DE EXPERIMENTOS UTILIZADO PARA LA OBTENCIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES	51
3.3.2 GRÁFICOS Y RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA EXPERIMENTACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE LOS FENOLES	53
3.4 OBTENCIÓN DE FLAVONOIDES	59
3.5 SACARIFICACIÓN DEL RESIDUO	63
3.5.1 DISEÑO DE EXPERIMENTOS, HIDRÓLISIS ÁCIDA.....	63
3.6 RESULTADOS Y GRÁFICOS DE LA HIDRÓLISIS ÁCIDA.....	65
3.7 AZÚCARES OBTENIDOS DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA, RESULTADOS Y GRÁFICAS	70
3.8 AZÚCARES TOTALES OBTENIDOS	71
3.9 COMPARACIÓN, OBTENCIÓN DE AZÚCARES CON MATERIA PRIMA SIN NINGÚN TRATAMIENTO	73
3.10 DETERMINACIÓN DE LIGNINA.....	74
4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	75
5 BIBLIOGRAFÍA.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1: Sección transversal de una fruta cítrica.	8
figura 2: Cítricos producidos en México.....	9
figura 3: Zona de producción de limón mexicano (color verde oscuro), limón persa (verde claro)	10
figura 4: Rendimiento y volumen de producción de limón, SIAP-SAGARPA, INEGI y secretaria de economía.....	11
figura 5: Precio y volumen de producción mensual, 2011-2013, SIAP-SAGARPA Y SNIIM	12
figura 6: Estructura química de los flavonoides.....	17
figura 7: Clasificación de los flavonoides.	18
figura 8: Biosíntesis de los Flavonoides.....	20
figura 9: Estructura molecular de la Hesperidina.....	21
figura 10: Estructura molecular de la Eriocitrina	21
figura 11: Estructura molecular de la Diosmina	22
figura 12: Amilosa polisacárido lineal.	23
figura 13: La amilopectina contiene ramificaciones	23
figura 14: Representación simplificada de la estructura de la celulosa.....	24
figura 15: Aldopentosas	25
figura 16: Aldohexosas	25
figura 17: Ácidos Urónicos	26
figura 18: a) tipos de monolignoles más comunes encontrados en los bloques de construcción de la lignina: 1: alcohol p-cumarílico, 2: alcohol coniferílico, 3: alcohol sinapílico, b) otros tipos de monolignoles (coniferil-derivados): 4: coniferaldehído, 5: alcohol	28
figura 19: Porcentaje de cambio en las emisiones de gases de efecto invernadero para diferentes biocombustibles en comparación con los combustibles fósiles.	31
figura 20: Diagrama general del proceso	34
figura 21: Cáscara de limón.....	35
figura 22: Cápsulas de porcelana en la estufa.....	36
figura 23: Equipo Soxhlet	38
figura 24: Diagrama para la obtención de los fenoles	40
figura 25: Diagrama para la obtención de los flavonoides.....	41
figura 26: Sacarificación del limón	44
figura 27: Hidrólisis enzimática	46
figura 28: Separación de solvente del aceite esencial mediante el baño maría.....	49
figura 29: Obtención de fenoles a T= 45 °C.....	55
figura 30: Diagrama de Pareto para los fenoles totales.....	56
figura 31: Comportamiento de las variables para la obtención de fenoles totales.....	56
figura 32: Interacción de las variables en la obtención de fenoles.....	57
figura 33: Superficie de respuesta de fenoles.....	58
figura 34: Obtención de flavonoides a T= 75 °C.....	60

figura 35: Diagrama de Pareto para la obtención de flavonoides	61
figura 36: Comportamiento de las variables en la obtención de flavonoides	61
figura 37: Interacción de las variables en la obtención de flavonoides	62
figura 38: Superficie de respuesta en la obtención de Flavonoides	62
figura 39: Azúcares obtenidos en la hidrólisis ácida a 130 °C	66
figura 40: Diagrama de Pareto para la obtención de azúcares, hidrólisis ácida	67
figura 41: Interacción de las variables en la obtención de azúcares, hidrólisis ácida.....	68
figura 42: Interacción de las variables para la obtención de azúcares, hidrólisis ácida.....	68
figura 43: Superficie de respuesta de la obtención de azúcares en la Hidrólisis ácida.....	69
figura 44: Resultados de la hidrólisis enzimática, comparación experimento 1 y experimento 2 ..	71
figura 45: Azúcares totales, azúcares obtenidos de la hidrólisis enzimática sumado con los azúcares de la hidrólisis ácida	72
figura 46: Comparación de resultados, azúcares totales, Sacarificación 1 y Sacarificación 2	74

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1: Composición química de los frutos cítricos.....	7
Tabla 2: Producción de limón en el año 2012(cosechado).	13
Tabla 3: Producción de limón en el año 2013(cosechado).	14
Tabla 4: Efectos de algunos alimentos con contenido fenólicos y flavonoides	16
Tabla 5: Clasificación de los flavonoides	19
Tabla 6: Factores experimentales para la creación de la matriz de diseño de experimentos para fenoles y flavonoides.....	42
Tabla 7: Factores experimentales para la creación de la matriz de diseño de experimentos para etanol, hidrólisis ácida.....	45
Tabla 8: Resultados materia prima	48
Tabla 9: Aceite esencial obtenido	50
Tabla 10: Composición del aceite esencial del limón.....	50
Tabla 11: Matriz experimental y resultados de obtención de fenoles y flavonoides	51
Tabla 12: Concentración de Fenoles expresados en mg de ácido gálico / g de cáscara b.s	54
Tabla 13: Concentración de Fenoles expresados en mg de ácido gálico / g de cáscara b.s	54
Tabla 14: Análisis de varianza de los fenoles	55
Tabla 15: Concentración flavonoides expresados en mg de quercetina/ g de cáscara b.s.....	59
Tabla 16: Concentración flavonoides expresados en mg de quercetina/ g de cáscara b.s.....	59
Tabla 17: Análisis de varianza para los flavonoides	60
Tabla 18: Matriz experimental y resultados de obtención de azúcares en la hidrólisis ácida.....	64
Tabla 19: Producción de azúcares totales en la hidrólisis ácida	66
Tabla 20: Análisis de varianza en la obtención de azúcares, hidrólisis ácida.....	67
Tabla 21: Resultados de la Hidrólisis enzimática	70
Tabla 22: Azúcares totales, azúcares obtenidos de la hidrólisis enzimática sumados con los azúcares de la hidrólisis ácida	72
Tabla 23: Comparación de resultados, azúcares totales.....	73
Tabla 24: Cantidad de lignina Klason	74

RESUMEN

Los limones son frutas cítricas ácidas, éstos son muy importantes ya que producen metabolitos primarios como grasas y proteínas, así como metabolitos secundarios como los alcaloides, aceites esenciales, terpenoides y uno de los más importantes son los flavonoides, el cual protege al fruto y muchos de sus nutrientes.

Se utilizó el limón mexicano, ya que es uno de los principales frutales dentro de los 112 reportados por el SIACOM (Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta), siendo el principal productor de este cítrico el estado de Michoacán, es también el principal cítrico cosechado después de la naranja con el 82% del total nacional y por ello uno de los cítricos con mayor incidencia de desechos industriales y en el campo.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas, frutas y vegetales, poseen un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, incluyendo derivados funcionales (ésteres, glucósidos), el grupo más importante de estos compuestos son los flavonoides, con una estructura molecular $C_6-C_3-C_6$. La identificación, cuantificación y extracción de los flavonoides ha despertado un gran interés debido a que se ha reportado que poseen propiedades benéficas para la salud del ser humano, tales como actividades anticancerígenas, antiinflamatorias, antivirales, antialérgicas, protección contra enfermedades del corazón y propiedades antioxidantes. En los frutos cítricos se presentan tres tipos de flavonoides: flavanonas glicosídicas, las flavonas polimetoxiladas y los flavonoles, siendo las cáscaras una importante fuente de estos compuestos.

El objetivo de este trabajo fue extraer y cuantificar el contenido fenólico de las cáscaras de cítricos cultivados en México, así como los flavonoides. Esto se determinó evaluando el mejor sistema de extracción de los compuestos fenólicos y flavonoides mayoritario, teniendo como variables la temperatura de extracción, la concentración del disolvente (etanol), y el tiempo de extracción. La cuantificación de los compuestos se realizó mediante la técnica de espectrofotometría. El mejor modelo de extracción de los compuestos fenólicos al igual que el de los flavonoides fue con una concentración de disolvente (Etanol) al 80%, con un tiempo de 12 horas y una temperatura de 45 °C para los fenoles y (75°C) para los flavonoides, obteniéndose 3.5538 mg/g b.s. y 3.3804 mg/g b.s. respectivamente. Finalmente, el residuo de las anteriores separaciones, se sacarificó con objeto de obtener sus azúcares y la posibilidad de obtener etanol de ellos. La sacarificación se realizó, primero con una hidrólisis ácida y segundo con el residuo del primer paso se sometió a una digestión enzimática y se obtuvieron los resultados siguientes, 30.18 g/L en la hidrólisis ácida y 36.103 g/L en la digestión enzimática.

Palabras claves: Biomasa, Sacarificación, Extraíble, Bioetanol

ABSTRACT

Lemons are acid citrus fruits, these are very important because they produce primary metabolites, such as fats and proteins and secondary metabolites such as alkaloids, essential oils, terpenoids and one of the most important, flavonoids, which protects the fruit and many of nutrients.

Was used the Mexican lime, as it is one of the main fruit within the 112 reported by the SIACOM (Agricultural Information System Consultation), being Michoacan state the largest producer of citric, the lemon is also the main citrus harvested after the Orange with 82% of the national total and therefore one of the highest incidence of citrus industrial waste and in the field.

Phenolic compounds are secondary metabolites of plants, fruits and vegetables, have an aromatic ring fused to one or more hydroxyl groups, including functional derivatives thereof (esters, glycosides), the most important group of these compounds are flavonoids with a molecular structure C₆-C₃-C₆. The identification, quantification and extraction of flavonoids has aroused great interest because it has been reported to have beneficial properties for human health, such as anti-cancer activity, anti-inflammatory, antiviral, antiallergic, protection against heart disease and antioxidant properties. In the citrus there are three types of flavonoids: glycosidic flavanones, the polymethoxylated flavones and flavonols being shells a major source of these compounds.

The objective of this study was to extract and quantify the phenolic content of citrus peels cultivated in Mexico as well as flavonoids. This was determined by evaluating the best system of extraction of phenolic compounds and major flavonoids, having as variables the extraction temperature, the concentration of solvent (ethanol), and the extraction time. Quantitation of the compounds was performed by spectrophotometry. The best model of extraction of phenolic compounds like the flavonoids was at a concentration of solvent (ethanol) 80% with a time of 12 hours and a temperature of (45 °C) for phenols and (75 °C) for flavonoids, yielding 3.5538 mg / g bs and 3.3804 mg / g b.s. respectively. Finally, the residue from the previous separations is saccharified to obtain the sugars and the possibility of obtain ethanol to them. The saccharification was carried out, first with an acid and the second hydrolysis step of the first residue was subjected to enzymatic digestion and the results below, 30.18 g / L in the acid hydrolysis and 36 103 g / L were obtained by enzymatic digestion.

Keywords: Biomass, Saccharification, Extractable, Bioethanol

1 INTRODUCCIÓN

La producción nacional de limón es de 2.055.209 toneladas, de las cuales los estados de Michoacán y Veracruz aportan el 50%. Cabe mencionar que el Valle de Apatzingán es la región productora más importante de México, siendo los municipios de Buenavista, Apatzingán y Aguililla, Estos tres municipios aportan en su conjunto el 73 por ciento de la producción estatal [61].

Las plantas han sido utilizadas en la medicina tradicional en diversas culturas a lo largo el mundo, estas también son la base de la cadena alimenticia que soporta todas las formas de vida en nuestro planeta. Pero además de esto las plantas producen sustancias como los carbohidratos, las proteínas y las grasas, que los investigadores han denominado METABOLITOS PRIMARIOS, dado que se encuentran en prácticamente todas las formas de vida y cumplen funciones básicas para la misma, existen otras que no se encuentran tan distribuidas y que se hallan restringidas solo a ciertas especies, géneros o familias como son los alcaloides, las saponinas esteroides, los aceites esenciales, los terpenoides, etc., a los cuales se les denomina METABOLITOS SECUNDARIOS. Dentro de este último grupo están los FLAVONOIDES [48].

Los flavonoides son polifenoles que se encuentran comúnmente en frutas, en cítricos, vegetales, nueces y granos; se pueden encontrar en forma libre o unidos a azúcares formando heterósidos; estos compuestos han despertado un gran interés en la investigación debido a que se ha reportado que poseen diversas propiedades benéficas para la salud del ser humano, tales como actividades anticancerígenas, antiinflamatorias, antivirales, antialérgicas, protección contra enfermedades del corazón, además de propiedades antioxidantes. Se ha reportado que los frutos cítricos tienen un alto contenido de compuestos fenólicos, siendo las cáscaras de estos frutos una fuente importante de estos compuestos [39] [49].

Los aceites esenciales también forman parte de este grupo, estos; generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser:

- Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos),
- Monoterpenos,
- Sesquiterpenos y
- Fenilpropanos.

Se encuentran principalmente en sacos de forma ovalada en el avedo o en la porción verde de la cáscara y actúa como una barrera tóxica natural para muchos microorganismos e insectos [47].

Por otro lado, la creciente necesidad de disminuir la dependencia hacia el petróleo, ha promovido la búsqueda de fuentes alternas de energía renovable para la generación de combustibles en grandes cantidades y que genere menos contaminación atmosférica (BIOCOMBUSTIBLES).

Los biocombustibles son aquellos combustibles producidos a partir de la biomasa y que son considerados, por tanto, una energía renovable. Se pueden presentar tanto en forma sólida (residuos vegetales, fracción biodegradable de los residuos urbanos o industriales) como líquida (bioalcoholes, biodiésel) y gaseosa (biogás, hidrógeno).

El bioetanol, es un biocombustible que se mezcla con éxito con la gasolina se diferencia de los combustibles tradicionales (petróleo, carbón y gas natural) en que no se encuentra en yacimientos, almacenado en la tierra, sino que se obtiene a partir de las plantas. Precisamente por esto, uno de sus principales atractivos es su carácter renovable y sostenible desde el punto de vista ambiental [20].

Por lo anterior, es importante el aprovechamiento de estos subproductos industriales, implementando un método de extracción para recuperar la mayor cantidad de compuestos con valor agregado.

1.1.1 JUSTIFICACIÓN

Michoacán es uno de los estados más importante en la producción de limón, este junto con el estado de Veracruz aportan el 50% de la producción nacional, sin embargo, existe una gran producción de limón que no cumple con la especificaciones requeridas para su exportación y por lo tanto es rechazado, mucho de este limón se abandona en los campos llegando a un estado de putrefacción que ya no es adecuado para el consumo humano, perdiéndose cantidades en toneladas y repercutiendo económicamente en el campo mexicano. Esto también ha llegado a considerarse como un problema de contaminación ambiental o bien un costo adicional en transporte y mano de obra [61].

A pesar de todos los posibles usos y beneficios de este producto, se ha considerado como material de desecho en muchas ocasiones, además de ser grandes cantidades, las industrias dedicadas al aprovechamiento del limón como la de jugos, la cáscara continúa siendo un material de desecho y esto implica la pérdida de estos biocompuestos.

Por otro lado, hoy en día uno de los retos más importantes consiste en satisfacer la demanda energética a nivel mundial, la cual ha sido cubierta por combustibles de origen fósil los cuales generan emisiones que provocan el efecto invernadero. Considerando lo anterior, se han desarrollado tecnologías que permiten utilizar el residuo final para la obtención de biocombustibles [34].

Razón por la cual consideramos conveniente aprovechar este limón residual buscando solucionar este problema de contaminación y dando una plusvalía al producto, teniendo en cuenta que estos biocompuestos obtenidos del limón tienen un potencial de comercialización importante.

1.1.2 HIPÓTESIS

La separación de metabolitos secundarios como los aceites esenciales, fenoles y flavonoides del limón residual permitirá un aprovechamiento integral de este cítrico.

1.1.3 OBJETIVOS

Objetivo general

Separar los compuestos contenidos en el limón con rendimientos aceptables que permitan el aprovechamiento integral del limón.

Objetivos específicos

- ❖ Realizar la extracción y cuantificación de los compuestos fenólicos de las cáscaras de las frutas cítricas en condiciones predeterminadas, evaluando el efecto del disolvente, temperatura y tiempo de extracción de los compuestos fenólicos, en un diseño factorial.
- ❖ Realizar la extracción y cuantificación de flavonoides de las cáscaras de las frutas cítricas en condiciones predeterminadas, evaluando el efecto del disolvente, temperatura y tiempo de extracción de los compuestos fenólicos, en un diseño factorial.
- ❖ Determinar las condiciones de extracción de los compuestos fenólicos mayoritarios.
- ❖ Determinar las condiciones de extracción con mayor concentración de flavonoides.
- ❖ Determinar el mejor solvente para la separación de los aceites esenciales con sus condiciones óptimas, por el método Soxhlet.
- ❖ Realizar la sacarificación del residuo obtenido en los procesos anteriores utilizando el método de superficie de respuesta para determinar las condiciones óptimas de la sacarificación.
- ❖ Cuantificación e identificación de los azúcares obtenidos.

1.2 ANTECEDENTES

Los compuestos fenólicos representan un numeroso grupo ampliamente distribuido en la naturaleza. Son componentes importantes en la dieta humana, el consumo promedio de fenoles en los países europeos se estima en 23 mg/día. Existe gran interés en los compuestos fenólicos debido a su efecto contra algunas enfermedades como ciertos cánceres y desordenes cardiacos derivados de su poderosa actividad antioxidante [28].

Los compuestos fenólicos poseen una estructura química especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante actuando como captore de radicales libres neutralizando peligrosas especies reactivas de oxígeno e iones metálicos quelantes. Además, debido a su reactividad, se encuentra en la mayoría de los casos combinadas como un ácido orgánico, una azúcar o bien, con ellas mismas para formar polímeros.

Los flavonoides uno de las grandes grupos de compuestos fenólicos junto con los ácidos fenólicos, son un grupo extenso de compuestos derivados del benzo- γ -pirano. En relación con el hombre, se utiliza para tratar enfermedades inflamatorias, cardiovasculares, de circulación sanguínea, antitrombica, anticancerígena, etc. [28].

1.3 HISTORIA DEL LIMÓN

Los cítricos se originaron desde hace unos 20 millones de años en el sudeste asiático. Desde entonces hasta ahora han sufrido numerosas modificaciones debidas a la selección natural y a hibridaciones tanto naturales como producidas por el hombre. La dispersión de los cítricos desde sus lugares de origen se debió fundamentalmente a los grandes movimientos migratorios; conquistas de Alejandro Magno, expansión del Islam, descubrimiento de América, etc. Este fue introducido por los árabes en el área mediterránea entre los años 1 000 a 1 200, siendo descrita en la literatura árabe a finales del siglo XIL.

En la actualidad este cítrico, es cultivado en muchos países muy importantes como Italia, España, Estados Unidos y Argentina, de los cuales México se considera un productor que tiene ventajas comparativas con respecto al resto del mundo, por el tipo de limón producido y sus características. También, representa una fuente considerable de ingresos para los agricultores mexicanos [36].

El inicio de la expansión de cultivo del limón en nuestra Nación, es a partir de 1979 donde se observa un proceso acelerado de crecimiento de la superficie sembrada y de la producción. Sin embargo, la tradición del cultivo del limón ha tenido fechas distintas y procesos diferentes: por ejemplo, en el caso del limón Mexicano la producción comercial se realiza desde 1911, el Estado de Michoacán es donde ocurre esto, cuando un grupo de inmigrantes italianos tenían en su hacienda alrededor de 80 mil limoneros dedicados a la exportación a EE.UU., por su parte, el Estado de Colima inicia el cultivo con fines comerciales a partir de 1925 [31].

1.3.1 FRUTOS CÍTRICOS

El fruto de los cítricos se denomina hesperidio, las frutas cítricas se definen como los tres géneros de la familia Rutáceas: *Citrus*, *Fortunella* y *Poncirus*, los dos últimos no tienen valor comercial, por lo que el género *Citrus* es el que representa mayor importancia económica.

Clasificación científica:

Reino: Plantae
Familia: Rutáceas
Género: *Citrus*

Actualmente, los frutos cítricos crecen en todas las regiones del mundo donde el clima no sea muy severo durante el invierno y existan condiciones favorables de suelo [55] [68].

1.3.2 MORFOLOGÍA DE CÍTRICOS

Las frutas cítricas están compuestas de tres diferentes partes morfológicas:

Epicarpio; Porción externa de la cáscara, también se le conoce como flavedo (Figura 1), aquí se encuentran los carotenoides, las glándulas oleosas que contienen los aceites esenciales característicos de cada cítrico [66] [67].

Mesocarpio; Se localiza inmediatamente debajo del epicarpio, también se le llama albedo (Figura 1). Es una capa blanca esponjosa que varía en espesor en los diferentes tipos de cítricos y consiste en dos largas células ricas en sustancias pécticas y hemicelulosas. Esta capa cubre completamente al endocarpio, el cual es

la porción comestible de los cítricos. Ambos, el flavedo y el albedo conforman el pericarpio, comúnmente conocido como la corteza o cáscara de la fruta.

Endocarpio; La parte comestible de las frutas cítricas (Figura 1), está compuesta por muchos segmentos, dentro de los cuales se encuentran las vesículas de jugo [67] [68].

En la tabla 1, se presenta la composición química de los cítricos [57] [62].

Tabla 1: Composición química de los frutos cítricos.

componentes	
Agua	
Azúcares reductores	
Sacarosa	
ácidos	
Sustancias nitrogenadas	
Lípidos	
Vitaminas	Vitamina c
	Vitamina B6
	Tiamina
	Riboflavina
	Niacina
Micronutrientes	Magnesio
	Calcio
	Zinc
	carotenos
Flavonoides	Flavononas glicosídicas
	Flavononas polimetoxiladas
Pectinas	

Referencia: Seok et al., 2004, Rincón et al., 2005

Los diversos constituyentes químicos están distribuidos a lo largo de varios tejidos, algunos se concentran más en unos tejidos que en otros. Por ejemplo, las flavononas glicosídicas se encuentran en mayor concentración en el albedo que en las vesículas de jugo o el flavedo. El albedo es rico en celulosa, hemicelulosa, lignina, sustancias pécticas y compuestos fenólicos. La limonina (compuesto amargo), es más alto en las semillas y membranas. Los azúcares están bien distribuidos en las células de todos los tejidos, pero las células del jugo almacenan

la mayor cantidad de azúcares en las vacuolas, así como compuestos nitrogenados, lípidos, compuestos fenólicos, vitaminas y sustancias inorgánicas [40] [66].

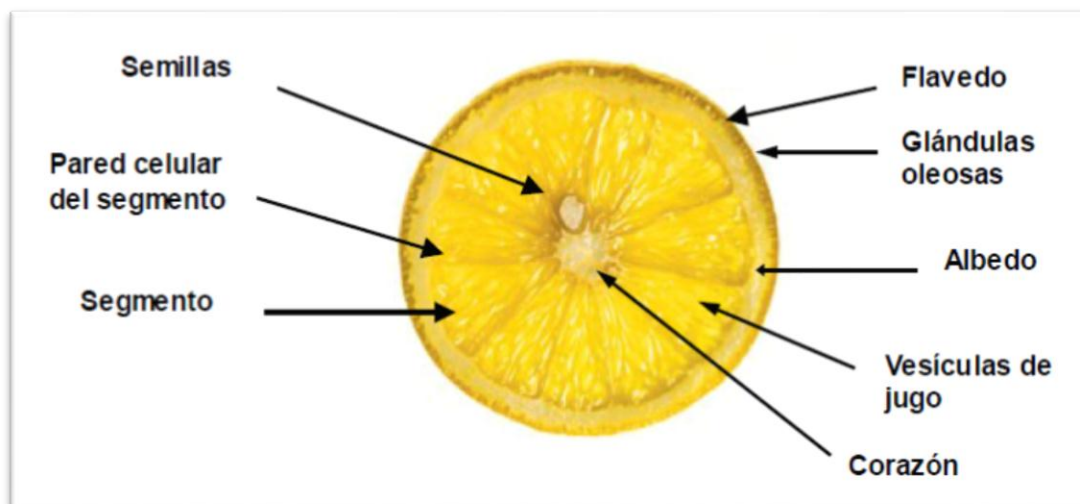


Figura 1: Sección transversal de una fruta cítrica, (Kawaii et al., 2000, Ting y Attaway, 1971)

1.4 LIMONES

Los limones son frutas cítricas ácidas que difieren de las otras variedades de cítricos en cuanto a que típicamente se consumen con otras comidas. El limón se produce generalmente en climas más fríos y también se adapta a climas secos. Los principales productores de limón son: México, La India, Argentina y Estados Unidos. México está ubicado en el primer lugar mundial en la producción de limones y limas. En el escenario de los frutales en México, el cultivo del limón mexicano es uno de los principales frutales dentro de los 112 reportados por el Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta (SIACON), después de la naranja sin clasificar y la naranja valencia.

En México, según el Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la SAGARPA, se reportan 4 tipos de limón:

1. El Limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*, Swingle),

- 2.- Limón Persa (*Citrus latifolia*, Tanaka) que botánicamente pertenecen al grupo de limas ácidas además del limón verdadero o
- 3.- limón italiano (*Citrus limón*, Burm)
- 4.- Limón real (*C. limón*).

Sólo México, Brasil, Egipto y Perú producen limón mexicano. Dado a sus condiciones climáticas, México dispone de limón durante todo el año, acentuando su producción durante mayo a octubre. En la Figura 2, se muestran frutos cítricos producidos en México [25].



Características del limón mexicano

El limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*), es uno de los frutales de mayor popularidad en el país debido a su riqueza en vitamina C, múltiples usos, y amplia distribución de árboles pequeños, glabros, con pequeñas espinas duras; hojas elípticas oblongas de 2 a 3 cm de longitud; de ápice romo o algunas veces redondeado o puntiagudo, los pecíolos manifiestamente cortos pero estrechamente halados, con articulación notoria, con pocas flores en las axilas, en su mayor parte no exceden de 0.5 cm de longitud a todo lo largo, 20-25 estambres, ovario grueso en el ápice; fruto redondeado, oval y pequeño (de 2.5 a 4 cm de diámetro), algunas veces con un pequeño pezón, 10 segmentos, poco áspero, excesivamente ácido. La utilización que se le da es el consumo en fresco en el mercado nacional o para la extracción de algunos subproductos como los aceites esenciales y las pectinas. En la figura 3, se muestran las zonas en las que se producen estos cítricos, coloreadas de verde oscuro la zona de producción de limón Mexicano, mientras que la zona donde se cultiva la mayoría del limón persa esta coloreado de verde claro. Su cultivo se realiza principalmente en la región del Pacífico Mexicano, como Michoacán y Colima siendo estos dos los más importantes de esta región, en el 2012 Michoacán rompió record en producción de limón y se consolidó como el número uno en producción de este cítrico en el País, produciendo 687.056 ton. Su cultivo también se lleva a cabo en Oaxaca, Guerrero y Jalisco con menor producción de este cítrico, mientras que en la región del Golfo de México, Veracruz, Tabasco y Yucatán, se cultiva el limón Persa [61].

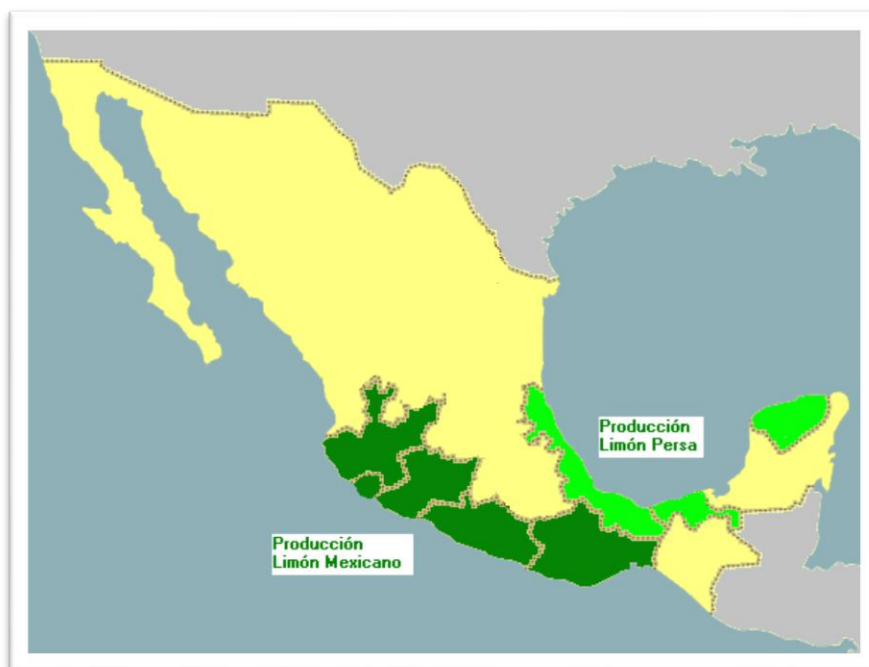


Figura 3: Zona de producción de limón mexicano (color verde oscuro), limón persa (verde claro), (SAGARPA, 2013).

1.4.1 PRODUCCIÓN DE LIMÓN EN MÉXICO

La producción de limón en México cuenta hoy con casi 170 mil hectáreas, ya que la superficie dedicada a este cultivo ha crecido 23% en los últimos diez años.

Entre 2011 y 2013, si bien no se logró producir el volumen récord alcanzado en 2008 de 2.2 millones de toneladas, se obtuvo una producción de 2.1 millones anuales y un rendimiento promedio de 14 ton/ha. Esto a pesar de que en esos años la superficie siniestrada aumentó a 11% de la superficie sembrada, en comparación con el decenio anterior, en que este promedio fue sólo el 5%.

México exporta cerca de un cuarto de la producción nacional, alrededor de 500 mil toneladas, principalmente a EEUU (90%). En la figura 4, se muestran las exportaciones, rendimiento y volumen de producción hasta el 2013. [61].

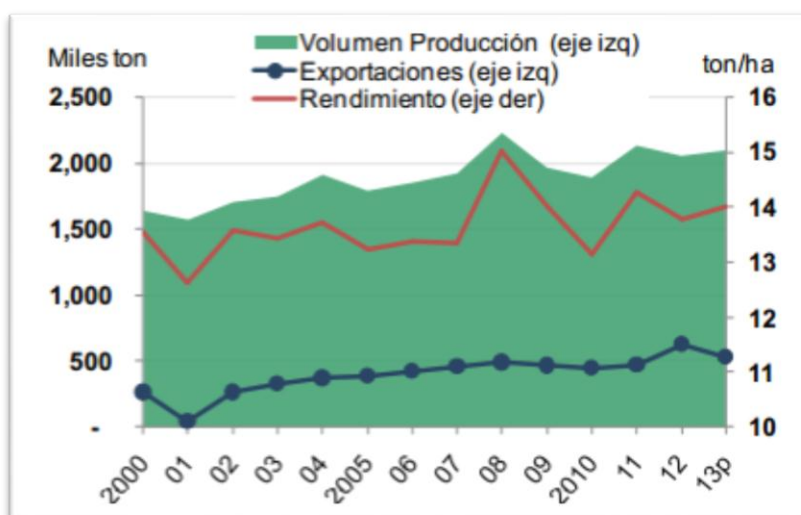


Figura 4: Rendimiento y volumen de producción de limón, (SIAP-SAGARPA, INEGI y secretaria de economía).

Nuestro País se dedica al cultivo de dos variedades (limón persa o “sin semillas” 30% y Mexicano o “con semillas” 82% del total nacional), las cuales están bien diferenciadas por zonas productoras, tipos de tierra (riego temporal), esquemas de comercialización, etc.

Si bien los cítricos se encuentran amenazados por la plaga del Huanglongbing o dragón amarillo, la producción de limón a nivel nacional se mantiene aún estable.

La plaga ha afectado especialmente a Colima, productor de limón agrio, que ha reducido su volumen en más de 50% desde 2008. Sin embargo, Michoacán, también productor de agrio, ha incrementado su volumen en más del 20%, y Veracruz, productor de persa, lo ha aumentado en más de 10%, compensando la caída de Colima.

La cosecha de limón se lleva a cabo todo el año, sin embargo, la mayor parte se obtiene a partir de mayo, por lo que entre enero y abril el menor abasto provoca incrementos en el precio. No obstante, el importante aumento del precio mostrado entre los primeros días de enero y los primeros días de marzo de 2014, no puede explicarse únicamente por la estacionalidad del producto, ni por deficiencias en la producción. El problema parece haber sido de comercialización, principalmente en Michoacán, al tenerse dificultades de traslado del limón a los centros de consumo debido a los problemas de inseguridad en el estado. En la figura 5, se muestra el precio y el volumen producido mensualmente [61].

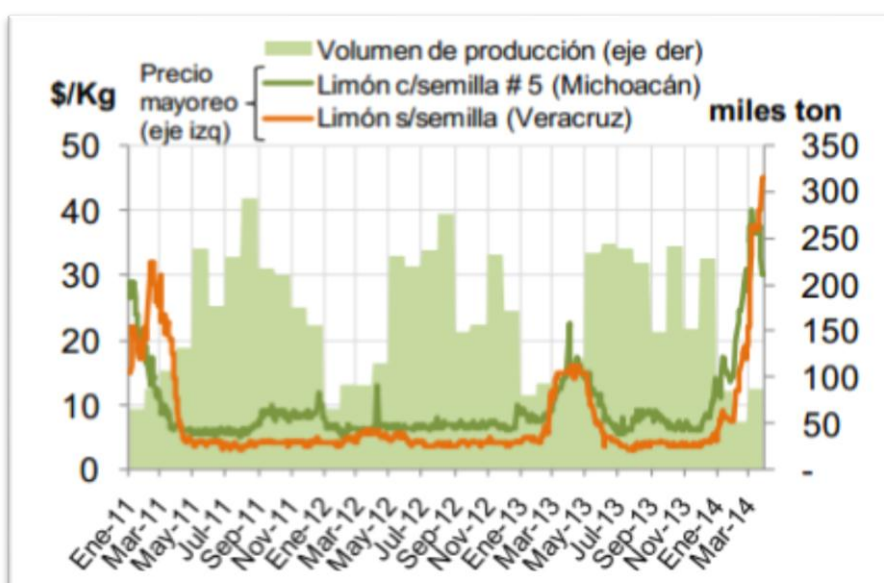


Figura 5: Precio y volumen de producción mensual, 2011-2013, (SIAP-SAGARPA Y SNIIM).

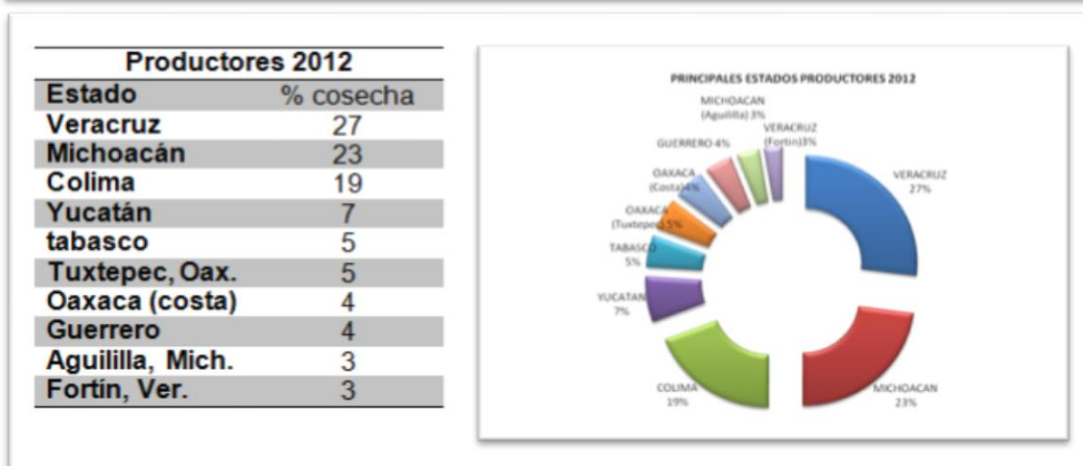
En Michoacán el cultivo y producción del limón mexicano tiene más de 100 años de historia, principalmente en el Valle de Apatzingán, que incluye los municipios de Apatzingán, Buenavista, Aguililla, Gabriel Zamora, Tepalcatepec, Mújica,

Parácuaro y La Huacana. Cabe mencionar que los primeros 3 en conjunto aportan el 73% de la producción estatal [61].

Michoacán se consolidó en el año 2012 como el segundo productor más importante de este cítrico en el país, en la variedad de limón Mexicano, superando así su histórico en volumen de producción, pues en una superficie sembrada de 42.941 hectáreas, se lograron producir 687.056 toneladas, lo que representa un incremento del 20%, para el 2013 se obtuvieron 40 mil toneladas más [61], en la tabla 2 y 3, se muestra la producción de limón cosechada en los años 2012 y 2013.

Es por ello que resulta importante el plantear este tipo de investigación con el fin de conocer los posibles impactos en el sector comercial, científico y ambiental.

Tabla 2: Producción de limón en el año 2012(cosechado).



Referencia: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2014)

Tabla 3: Producción de limón en el año 2013(cosechado).

Productores 2013	
Estado	% cosecha
Veracruz	30
Michoacán	26
Colima	13
Oaxaca	10
Yucatán	6
Tabasco	4
Guerrero	4
Jalisco	1
Tamaulipas	1
Puebla	1



Referencia: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2014)

1.5 ACEITES ESENCIALES

El aceite esencial se encuentra principalmente en sacos de forma ovalada en el avedo o en la porción verde de la cáscara y actúa como una barrera tóxica natural para muchos microorganismos e insectos [30]. El aceite esencial es un antidepresivo, sedante, los aroma terapeutas creen que este aroma ayuda a mejorar la comunicación y es muy efectivo en contra de la celulitis, porque activa la circulación. Se utiliza en la industria de fármacos y como cosméticos porque limpia y revive la piel opaca, ayudando la eliminación de excesos de fluidos y toxinas, también es usado por sus propiedades germicidas, antioxidantes y anticancerígenas en la producción de fármacos [12] [29].

La fracción volátil de los aceites esenciales se compone de hidrocarburos y sesquiterpeno y de los derivados oxigenados: aldehído, alcoholes, éster y óxidos. También comprende alcoholes, aldehídos y ésteres alifáticos. El componente principal es limoneno, generalmente presentan entre 60 y 70%, hay cantidades apreciables de β -pineno (9-18%) y β -terpineno (7-11%), mientras que los compuestos oxigenados representan entre el 2.3 y 6.3%. La composición de la fracción volátil de los aceites esenciales muestra alguna variación cíclica durante el año [46]. Estas variabilidades son principalmente debido a la clase de limón en los diferentes períodos del año [62].

1.6 COMPUESTOS FENÓLICOS Y FLAVONOIDES

Los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, incluyendo derivados funcionales (ésteres, glucósidos.). Los fenoles son metabolitos secundarios de las plantas que les confieren cualidades deseables como indeseables, tienen un papel importante en el color, en las cualidades sensoriales y nutricionales así como en las propiedades antioxidantes de los alimentos y no están presentes en alimentos provenientes de animales. Estos compuestos consisten en dos grupos: flavonoides y ácidos cinámicos, de los cuales, los flavonoides son el grupo más importante [49].

Algunos de los efectos de los polifenoles en la calidad de los alimentos son los siguientes [64]:

1. Causan astringencia indeseable en algunas frutas y deseable astringencia en sidras y vinos.
2. En el desarrollo del color final, sabor y aroma en productos como cocoa, en donde la condensación de los productos de las catequinas juegan un papel importante.
3. La formación de precipitados en jugos de manzana, cervezas y vinos se atribuye a la interacción de proteínas y polímeros fenólicos.
4. El desarrollo de decoloración café debido a la oxidación de sustancias fenólicas mediante enzimas polifenolasas.
5. La formación de compuestos oscuros con el hierro por la acción secuestrante de los fenoles dihidricos y trihidricos, lo que resulta en una apariencia indeseable en alimentos enlatados.

Tabla 4: Efectos de algunos alimentos con contenido fenólicos y flavonoides

Efectos favorables sobre sobre el perfil lipídico	Pescado azul, aceite de oliva virgen, nueces y otros frutos secos, legumbres, vino y otras bebidas alcohólicas, manzanas, moras, cebada.
Efecto antioxidante	Limón, tomate, manzana, arándanos, ajo.
Efecto antiinflamatorio	Ginseng, avena
Efecto anti proliferativo	Naranja, berenjena, espinacas, soja, coliflor, brócoli, perejil, té verde
Efecto antimicrobiano	Arándanos, ajos, cebolla, té verde
Efecto antiestrogénico	Anís, soja, repollo

Referencia: St-Onge, M.P., 2005.

La naturaleza química de los flavonoides depende de la clase estructural, del grado de hidroxilación, de los sustituyentes que contenga, y del grado de polimerización [16].

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), Figura 6, formado por quince carbonos, distribuidos en tres anillos: dos anillos bencénicos de 6 carbonos (A y B), conectados mediante un anillo heterocíclico C que puede ser pirano o pirona (si tiene un doble enlace en la posición 4).

La identificación, cuantificación y extracción de los flavonoides ha despertado un gran interés debido a que se ha encontrado que poseen propiedades benéficas para la salud del ser humano, tales como actividades anticancerígenas, antiinflamatorias, antivirales, antialérgicas, protección contra enfermedades del corazón y propiedades antioxidantes ya que retardan los cambios oxidativos en los alimentos, mejorando así la calidad y el valor nutricional de estos. Todos estos efectos en la salud atraen la atención de incorporar éstos compuestos a los productos alimenticios [11] [46].

Los flavonoides están presentes en la mayoría de las plantas, sin embargo, existen unos que son específicos de los cítricos y sus patrones varían dependiendo de cada especie, estos compuestos son: las flavononas glicosídicas y las flavonas polimetoxiladas. En la figura 6 se muestra la estructura química de los flavonoides. Los principales flavonoides de los cítricos son: antocianinas, flavones, flavonoles o

flavononas. Las flavononas glicósídicas más comunes en las frutas cítricas son: hesperidina, naringina, neohesperidina, narirutin, nobiletin [6].

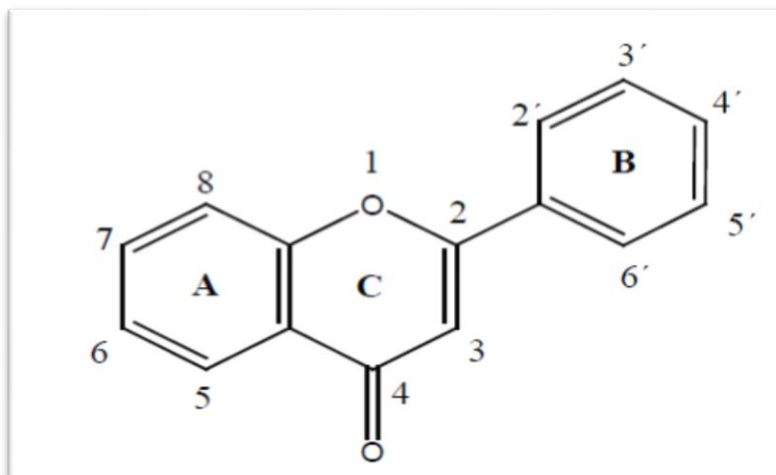


Figura 6: Estructura química de los flavonoides. (Asami et al., 2003).

En plantas se han descrito más de 5000 flavonoides naturales y en función de su estructura química se han clasificado en 6 grupos los cuales se muestran en la figura 7. [9] Se incluyen: antocianidinas, pigmentos responsables de los colores rojo y azul de las frutas, jugos de frutas, vinos y flores; las catequinas, las flavanonas y flavanonas glicósídicas encontradas en cítricos y en la miel; y las flavonas, flavonoles y flavonol glicósidos encontrados en té, frutas, vegetales y miel [52].

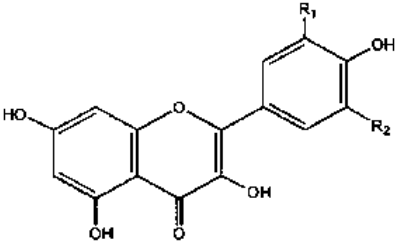
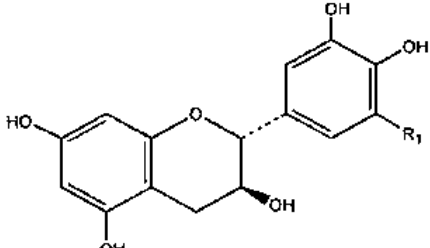
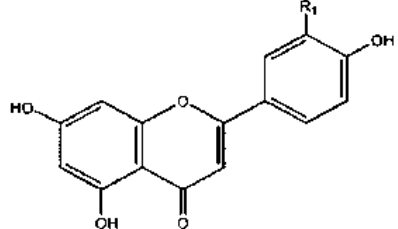
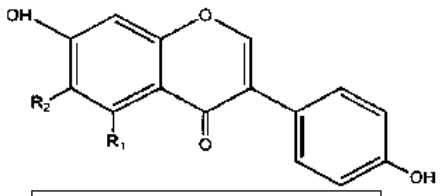
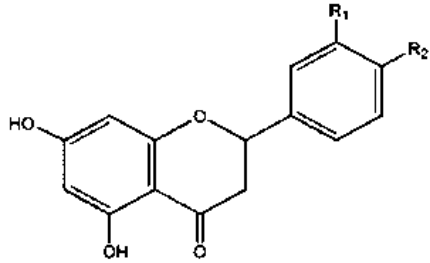
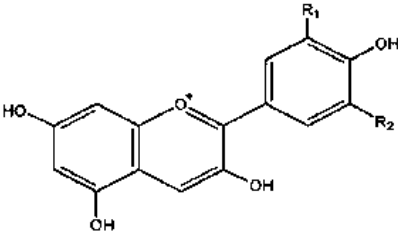
Flavonoles	Flavanoles (carece de doble enlace en posición 4 del anillo C)
 $R_1 = H; R_2 = H$: Kaempferol $R_1 = OH; R_2 = H$: Quercetina $R_1 = OH; R_2 = OH$: Miricetina $R_1 = OCH_3; R_2 = H$: Isohammetina	 $R_1 = H; R_2 = H$: (+) Catequina $R_1 = OH; R_2 = H$: (+) Galocatequina
Flavonas	Isoflavonas (el anillo fenólico B está unido al átomo C3 del anillo de la pirona)
 $R_1 = H; R_2 = H$: Apigenina $R_1 = OH; R_2 = H$: Luteolina	 $R_1 = H; R_2 = H$: Daidzeina $R_1 = OH; R_2 = H$: Luteolina $R_1 = H; R_2 = OCH_3$: Gluciteina
Flavanonas	Antocianidinas
 $R_1 = H; R_2 = OH$: Naringenina $R_1 = OH; R_2 = OH$: Eriodictiol $R_1 = OH; R_2 = OCH_3$: Hesperetina	 $R_1 = H; R_2 = H$: Pelargonidina $R_1 = OH; R_2 = H$: Cianidina $R_1 = OH; R_2 = OH$: Delphinidina $R_1 = OCH_3; R_2 = OH$: Petunidina $R_1 = OCH_3; R_2 = OCH_3$: Malvidina

Figura 7: Clasificación de los flavonoides. (Bocco et al., 1998).

Tabla 5: Clasificación de los flavonoides

clases	Subclases	ejemplos
Flavonoides	Flavonol, flavan, (2-fenilbenzopiranos), flavononas, antocianinas, flavonoles, flavonas, flavan-3-ol, flavan-3, 4-diol	Catequina, (+)-catequina, (+)-galocatequin, (-)-epicatequina, (-)-epiquetina-3-galleto, (-)-epigallocatequina-3-galleto
isoflavonoides	(3-benzopiranos), isoflavana, isoflavanona, isoflavonol	Daidzeina, genisteina, gliciteina, biochanina A, formononetina, lespedol, Ambanol
Flavonoides menores	aurona	Sulfuretina, letosidina

Referencia: Merken y Beecher, 2000.

1.6.1 BIOSÍNTESIS DE LOS FLAVONOIDES

La vía del ácido shikímico se inicia en los plastos por condensación de dos productos fotosintéticos, la eritrosa 4-P con el fosfoenolpiruvato (PEP), y por diversas modificaciones se obtiene el ácido shikímico, del cual derivan directamente algunos fenoles en los vegetales. Pero la vía del ácido shikímico normalmente prosigue, y la incorporación de una segunda molécula de PEP conduce a la formación de fenilalanina.

La vía biosintética de los flavonoides, (figura 8) comienza cuando la fenilalanina, por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) se transforma en ácido cinámico, que luego es transformado en ácido p-cumarínico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel de anillo aromático, y la acción de una CoA ligasa lo transforma en cumaril-SCoA, el precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal, entre los que se encuentran los flavonoides [38].

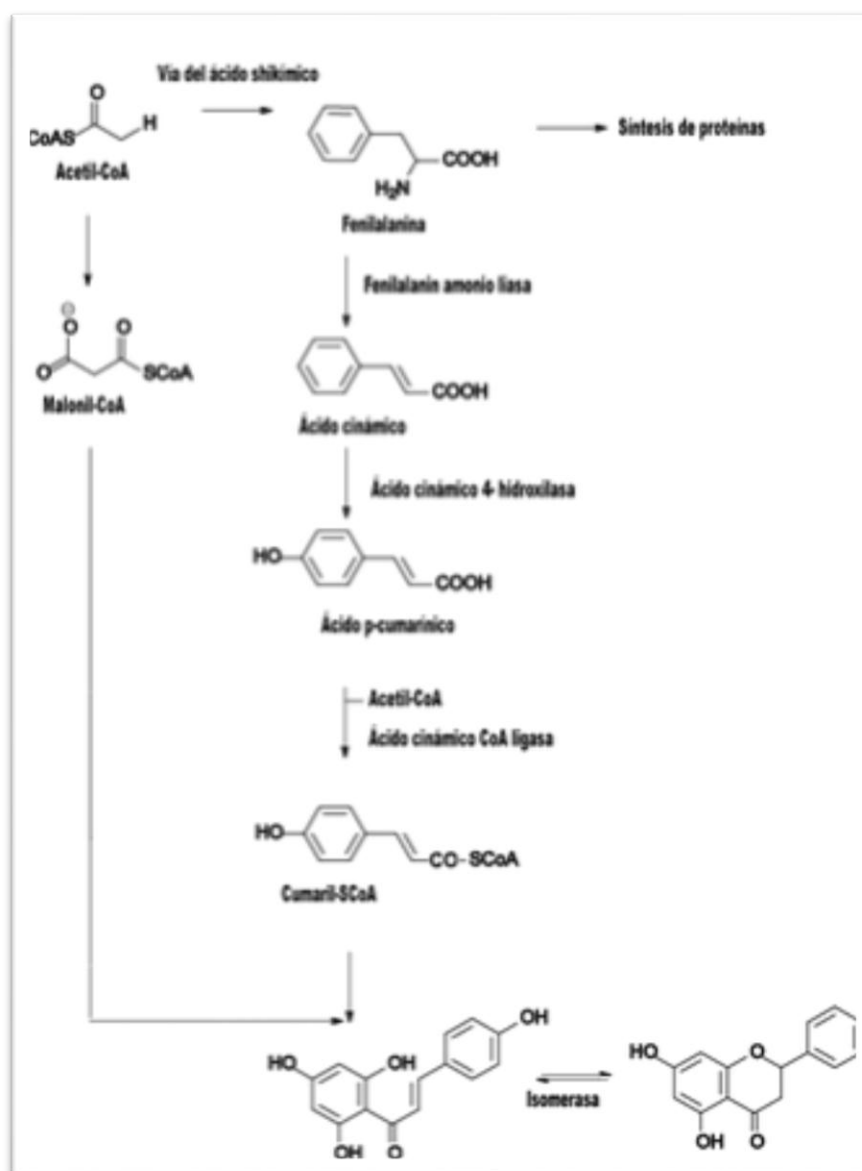


Figura 8: Biosíntesis de los Flavonoides (Palazón et al., 2009)

1.6.2 HESPERIDINA

La hesperidina, es una flavanona glicosídica presente en frutas y vegetales, en los frutos cítricos se encuentra en la naranja, en mandarinas, limones, limas y en algunos híbridos presenta efectos benéficos a la salud: reduce los niveles de colesterol, tiene actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria, propiedades sedantes que aumentan el sueño, por lo que se ha estudiado en ratas, también su

aplicación en fármacos y posee efectos anticancerígenos en lengua, colon y esófago [15] [22].

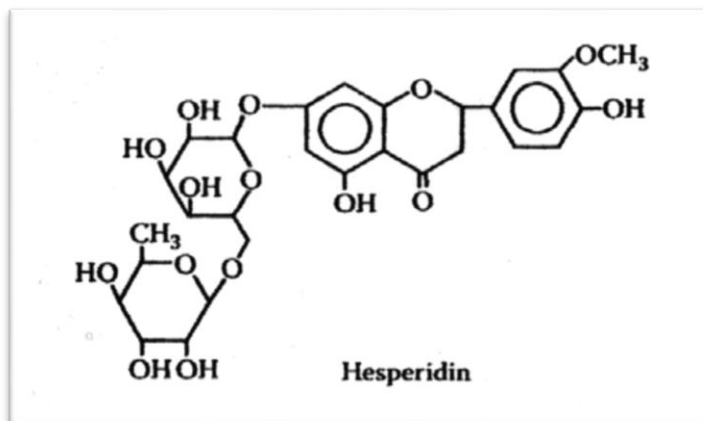


Figura 9: Estructura molecular de la Hesperidina. (Del Rio et al., 2004, Eskin y Snait, 2006)

1.6.3 ERIOCITRINA

Es una flavonona glicosídica abundante en limones y limas, pero no está presente en todos los cítricos. Se obtiene de la cáscara y se utiliza en múltiples complejos vitamínicos, en los cuales se aprovecha su alta actividad antioxidante [15].

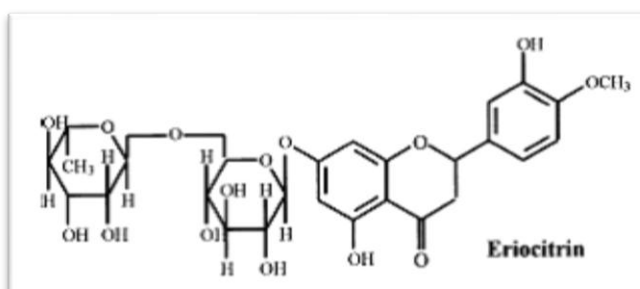


Figura 10: Estructura molecular de la Eriocitrina. (Del Rio et al., 2004).

1.6.4 DIOSMINA

Es una flavona que tiene importantes aplicaciones farmacológicas, siendo el ingrediente activo en muchos medicamentos para el tratamiento de enfermedades del sistema circulatorio, artritis reumática e insuficiencia venosa, además posee propiedades antioxidantes [15].

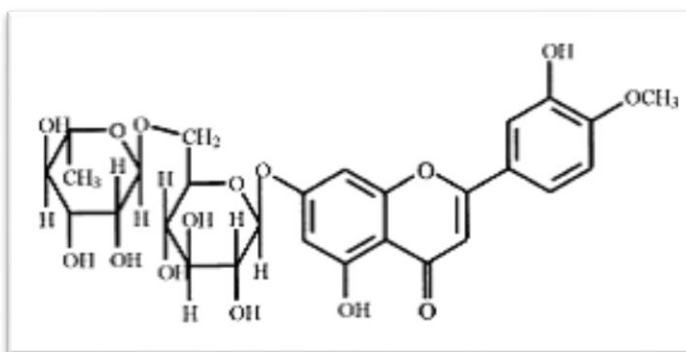


Figura 11: Estructura molecular de la Diosmina.
(Del Rio et al., 2004)

1.7 CARBOHIDRATOS

Son compuestos orgánicos constituidos por carbono, hidrogeno y oxígeno, normalmente con una relación atómica hidrógeno/oxígeno 2 a 1, por lo que su fórmula empírica, con algunas excepciones, es $C_n(H_2O)_m$. se encuentra de manera natural en células vegetales como animales y son los compuestos orgánicos más abundantes sobre la tierra. Se ha estimado que la mitad del carbono orgánico terráqueo está formado de carbohidratos, presentes hasta en un 75% del peso de las plantas.

Aun cuando se reporta que más de un 90% de los carbohidratos está en forma de polisacáridos, se pueden clasificar en:

- 1) Monosacáridos representados por la glucosa
- 2) Oligosacáridos con la sacarosa como su mayor manifestación y
- 3) Polisacáridos tales como la celulosa, hemicelulosa y almidón.

1.8 ALMIDÓN

Es el componente principal de semillas de cereales (maíz, trigo, arroz, avena, cebada, sorgo, etc.) y de tubérculos comestibles (papa, mandioca, camote, etc.).

Normalmente está compuesto por un 28% de amilosa, polisacárido lineal (figura 12) y el resto amilopectina, polisacárido ramificado (figura 13).

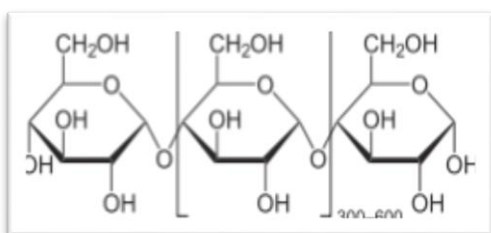


Figura 13: Amilosa polisacárido lineal, (Salinas callejas, 2009)

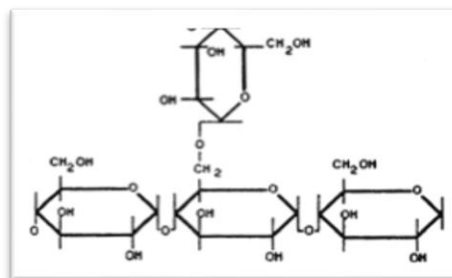


Figura 12: La amilopectina contiene ramificaciones, (Salinas Callejas, 2009)

1.9 POLISACÁRIDOS

El componente polisacárido comprende de polisacáridos de alto peso molecular (celulosa y Hemicelulosa), que representa el 60-80% del total de los materiales lignocelulosicos.

1.9.1 CELULOSA

La celulosa es un polisacárido lineal de elevado peso molecular cuyo grado de polimerización va desde 200 hasta 10 000 unidades de β -glucopiranosidos unida por medio de enlaces glucosídicos (β -1,4), como se puede observar en la figura 14. El enlace asídico o glucosídico, es formado por medio de la reacción del grupo $-OH$ hemiacetálico del carbono anomérico (C1) de la β -D glucopiranososa con el grupo $-OH$ del C4 de la otra β -D glucopiranososa, en donde uno de los extremos de cada cadena presenta en el carbono anomérico un grupo aldehído de carácter reductor.

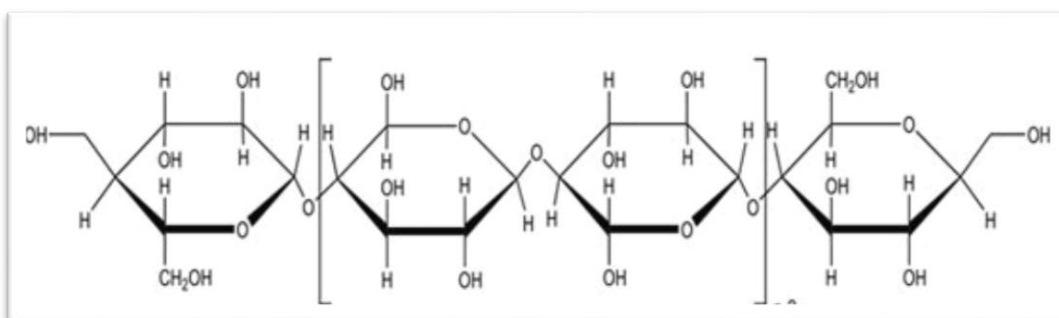


Figura 14: Representación simplificada de la estructura de la celulosa, (Taylor & Francisco, production and utilization of bioethanol)

La conformación piranosa, donde los carbonos y oxígenos son tetraédricos y la forma más estable es la de silla, representa grupos $-CH_2OH$, $-OH$ y los enlaces glucosídicos en posición ecuatorial, mientras que los hidrógenos se encuentran en posición axial. Lo anterior ocasiona que los grupos $-OH$ salgan lateralmente permitiendo con ellos a la celulosa formar uniones inter e intramoleculares por puentes de hidrógeno dando lugar a las fibrillas elementales, las cuales se encuentran formadas por entre 40 y 100 cadenas de celulosa en donde se presentan zonas con una estructura cristalina, que le confieren a la celulosa gran resistencia, mientras que otras regiones son amorfas y le otorgan elasticidad, la presencia de dichas regiones en la fibrilla elemental permite una mayor reactividad ya que gracias a ellas existe una mejor penetración de reactivos en el material con lo cual las enzimas del tipo de las celulasas pueden trabajar mejor si se aumenta la proporción en estas zonas.

Las microfibrillas dan lugar a las paredes celulares de los vegetales, éstas pueden ser orientadas en diversas formas de acuerdo a la cantidad de capas de fibras elementales que posean. Este tipo de estructura presentan los grupos $-OH$ formados por puentes de hidrógeno en una estructura similar a una cinta que se encuentra cubierta en una superficie por hidrógeno, de lo cual resulta una molécula hidrofóbica.

1.9.2 HEMICELULOSA

Las hemicelulosas también denominadas poliosas, están constituidas por polímeros de unidades de anhidro, azúcares unidas por enlaces glucosídicos, formadas por más de un tipo de azúcar (hexosas o pentosas), y además presentan ramificaciones y sustituciones. Su papel es suministrar la unión entre la lignina y la celulosa. Su estado natural existe en forma amorfa con un grado de polimerización que no excede de 200 (G.P.).

En las figuras 15, 16 y 17 se presentan estructuras lineales y cíclicas de los monosacáridos que forman las hemicelulosas [39].

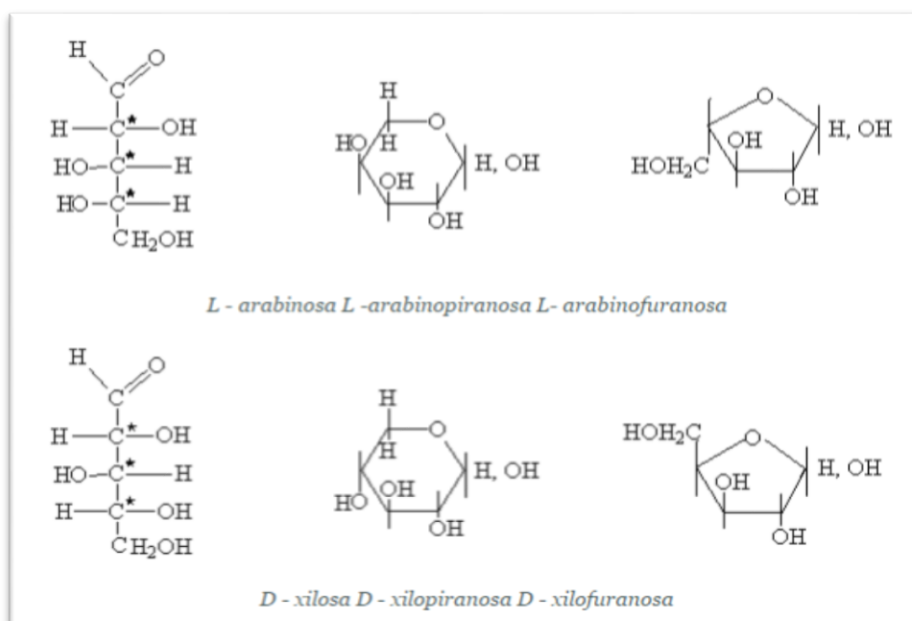


Figura 15: Aldopentosas, (Kang et all., 2006).

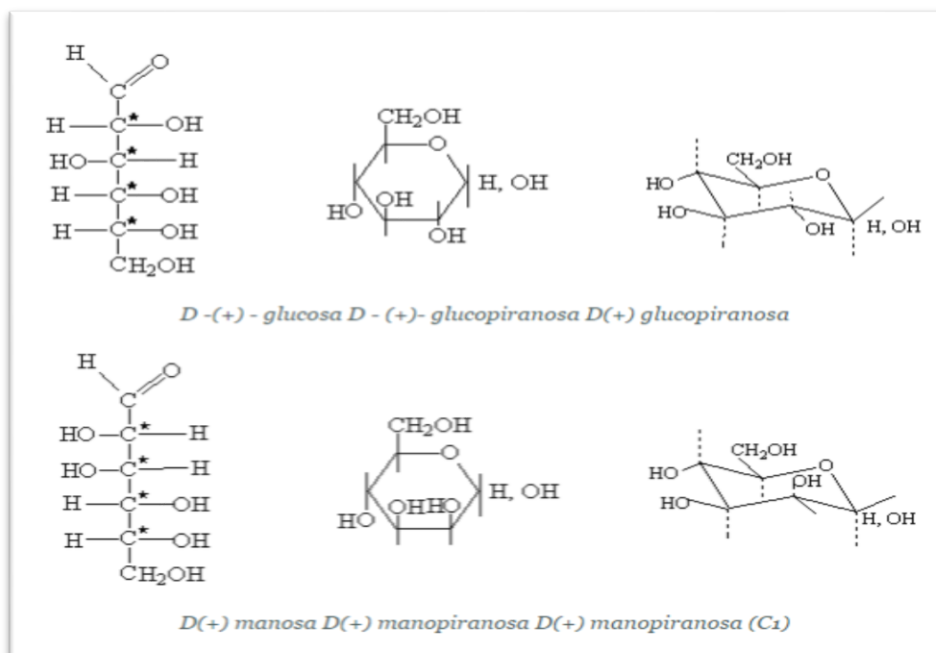


Figura 16: Aldohexosas, (Kang et all., 2006).

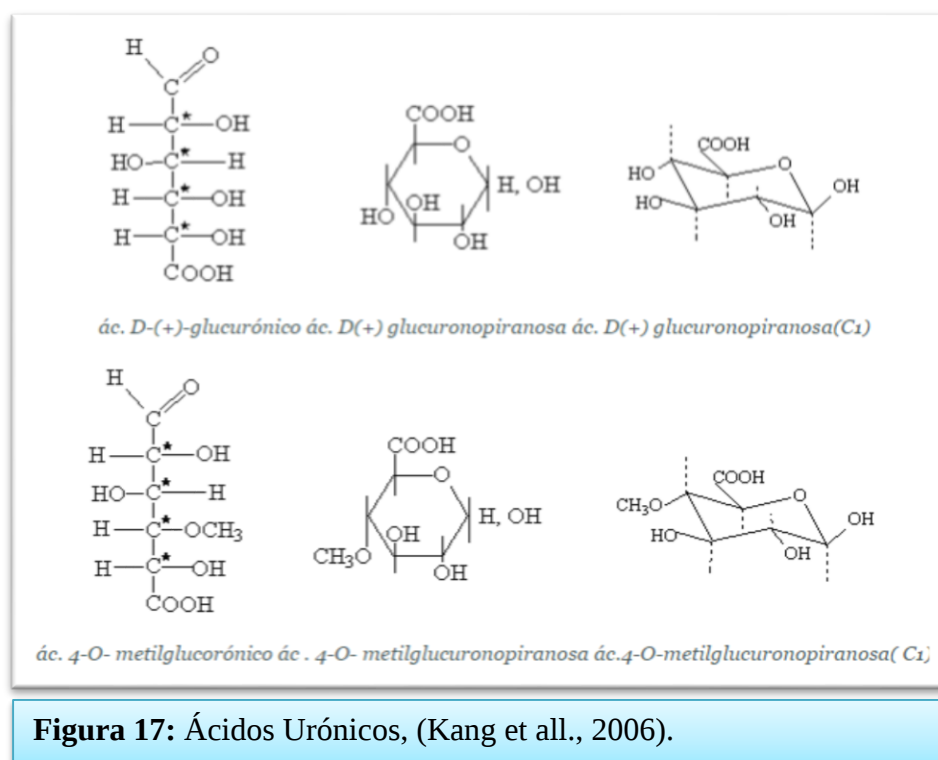


Figura 17: Ácidos Urónicos, (Kang et all., 2006).

Las hemicelulosas presentan estructuras complejas formada por diferentes tipos de monosacáridos, monosacáridos metilados, ácidos aldurónicos (ácido que se obtiene por la oxidación del carbono seis) y desoximonosacárido, como la ramnosa y fucosa.

1.9.3 LIGNINA

Es la tercera fracción mayoritaria de la biomasa lignocelulósica. Se trata de un polímero tridimensional amorfo formado por la polimerización deshidronegativa de unidades de fenilpropano ligadas por diferentes tipos de enlaces que se alternan de manera desordenada.

Se caracteriza por ser un complejo aromático (no carbohidrato) del que existen muchos polímeros estructurales (ligninas). Resulta conveniente usar el término lignina en un sentido colectivo para señalar la fracción lignina de la fibra. Después de los polisacáridos la lignina es el polímero orgánico más abundante en el mundo

vegetal. Es importante destacar que es la única fibra no polisacárido que se conoce [5].

Los monómeros que forman la lignina son alcoholes cinamílicos, diferenciándose entre sí gracias a las diferentes sustituciones que presenta el anillo aromático. Así, el alcohol *p*-cumarílico da lugar a las unidades *p*-hidroxifenilo (unidades H) el cual no presenta ningún sustituyente; el alcohol coniferílico da lugar a la formación de unidades guayacilo (unidades G) presentando un grupo metóxilo en la posición 3 del anillo aromático y el alcohol sinapílico que da lugar a las unidades siringuilo (unidades S) presenta dos grupos metóxilo en posición 3 y 5 de dicho anillo.

La polimerización de estos precursores durante la formación de la pared celular es producida por medio de la sucesión de una etapa enzimática y una etapa química. Siendo en la primera etapa oxidados los precursores por peroxidases de la pared, resultando radicales fenoxilo [33], que enseguida durante la etapa química reaccionan al azar entre ellos. En esta etapa se generan una gran variedad de formas resonantes que pueden reaccionar unas con otras, por ello que la lignina no presenta una estructura única [32].

Tipos de ligninas

De acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen las plantas existen diferentes tipos de ligninas:

Gimnoespermas (ligninas G)

Este el tipo de lignina más sencilla, se encuentra formadas por unidades del tipo G (guayacilo ó guayacilpropanos). Es posible encontrar unidades del tipo S, en una proporción $S/G = 1/10$ sin embargo, son menos frecuentes.

Angioespermas leñosas (ligninas G/S)

Están conformadas por unidades del tipo S y del tipo G aproximadamente en la misma proporción. Los grupos metóxilo, en posición 3 y 4, del anillo aromático permiten la reducción de formación de los enlaces tipo éter, y sobre todo los enlaces C-C, con los cuales se reduce el grado de polimerización y en menor proporción la condensación.

En general, las ligninas son copolímeros que se derivan principalmente de tres unidades fenilpropano-monoméricas (monolignoles) básicas: alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico, cuyas estructuras se muestran en la figura 18, [27]. Los monolignoles son dirigidos (temporal y especialmente) a diferentes tipos de regiones de la pared celular, en las que polimerizan formando biopolímeros

con propiedades biofísicas características, los cuales en conjunto refuerzan la pared celular. Las ligninas son consideradas mezclas racémicas, como se evidencia por análisis de diversos fragmentos diméricos tales como; ($\pm$)-pinoresinols y ($\pm$)-siringoresinols [14].

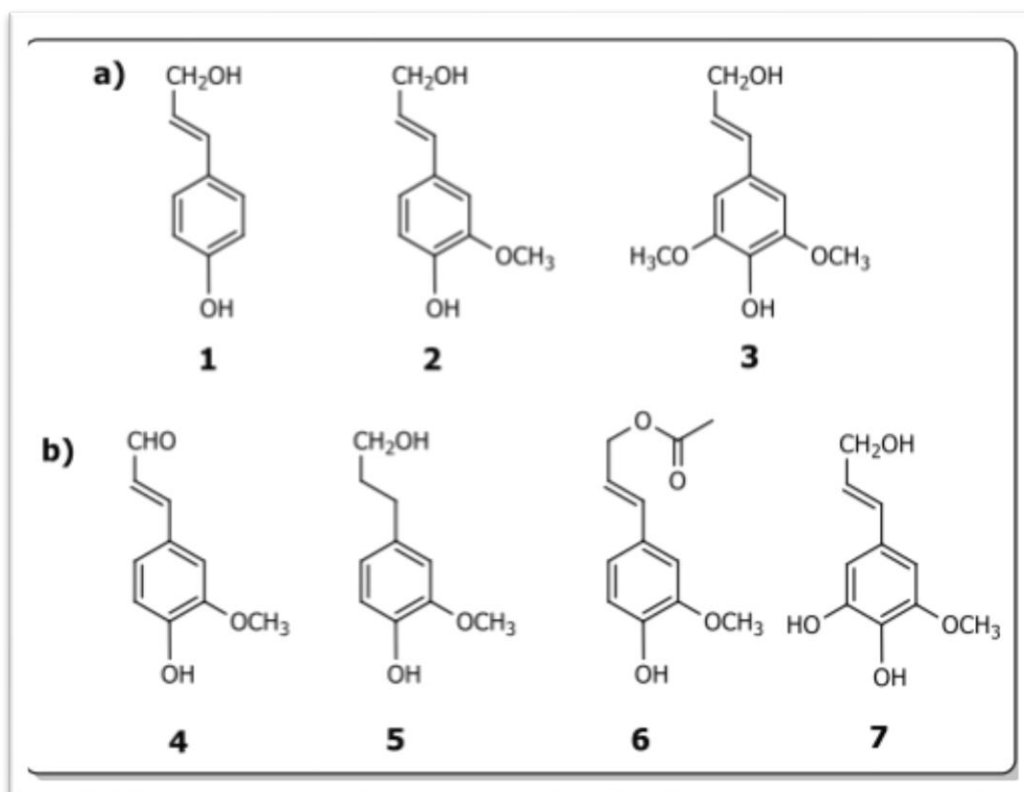


Figura 18: a) tipos de monolignoles más comunes encontrados en los bloques de construcción de la lignina: 1: alcohol p-cumarílico, 2: alcohol coniferílico, 3: alcohol sinapílico, b) otros tipos de monolignoles (coniferil-derivados): 4: coniferaldehído, 5: alcohol, (Gellerstedt, G. & Henriksson, G. 2008).

Los tres principales monolignoles (figura 18 a) [27] se forman en el citoplasma a través de la “ruta shikimato” que produce fenilalanina como intermedio clave. Los monolignoles se generan mediante reacciones de desaminación, hidroxilación, reducción y metilación catalizadas por diversas enzimas. Estos monolignoles reaccionan en la pared celular, a través de reacciones de oxidación catalizadas por peroxidasas (intermedios radicalarios) para formar finalmente polímeros de ligninas [13] [43].

1.10 TRATAMIENTO PARA LA SEPARACIÓN DE BIOMASA

Podemos definir como el fraccionamiento de la biomasa como el conjunto de procesos físicos y/o químicos que conducen a la separación selectiva de sus polímeros. Los polisacáridos, celulosa y hemicelulosa, son hidrolizados en medio ácido con obtención de soluciones azucaradas. La fracción mayoritaria de la biomasa es celulosa, compuesta por largas cadenas de glucosa unidas por enlaces $\beta(1,4)$ que, a su vez, se agrupan en estructuras superiores de gran cristalinidad.

La hidrólisis de la celulosa puede realizarse mediante procesos ácidos y enzimáticos.

1.10.1 HIDRÓLISIS ÁCIDA

La hidrólisis ácida consiste en un proceso químico que, mediante el empleo de catalizadores ácidos, transforman las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa (celulosa y hemicelulosa) en sus monómeros elementales. La hidrólisis ácida de los materiales lignocelulósicos es un proceso conocido desde 1819. [42]. Este tipo de hidrólisis puede realizarse empleando diferentes tipos de ácidos como el ácido clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y fórmico. Sin embargo, los ácidos clorhídrico y sulfúrico han sido empleados a escala industrial [26].

1.10.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis enzimática es un proceso catalizado por un grupo de enzimas denominadas genéricamente celulasas, que son en realidad, una mezcla de distintas actividades enzimáticas cuya acción conjunta produce la degradación de la celulosa. Las plantas superiores, algunos invertebrados y principalmente microorganismos (hongos y bacterias) producen este tipo de enzimas. Las celulasas de origen fúngico, principalmente de los géneros *Trichoderma*, *Phanerochaete* y *Fusarium*, han sido estudiadas por las capacidades de estos microorganismos de producirlas en grandes cantidades y de forma extracelular, facilitando su separación en medios de cultivos. El campo celulítico de hongos está

formado por distintos componentes que actúan sinérgicamente. Este sistema enzimático tiene tres tipos de actividad cuya denominación y mecanismo de acción son las siguientes [51].

- Endo- β -glucanasas
- Exo- β - glucanasas
- β -glucosidasas

La endoglucanasa actúa al azar en el interior del polímero, hidrolizando enlaces β -(1,4) y generando nuevos finales de cadenas no reductores. Puede actuar sobre celodextrinas y derivados sustituidos como carboximetilcelulosa (CMC) e hidroximetilcelulosa (HMC), así como celulosa amorfa, pero no actúa sobre celulosa cristalina ni sobre celobiosa. Supone, aproximadamente un 20% del total de proteínas del complejo.

La celobiohidrolasa actúa sobre los extremos no reductores de la cadena generados por la endoglucanasa, liberando moléculas de celobiosa. Esta enzima tiene actividad sobre la celulosa cristalina y amorfa y sobre celo dextrinas, pero no actúa sobre derivados sustituidos ni sobre celobiosa. Esta enzima constituye del 50 a 80% del complejo celulítico.

La glucohidrolasa se encuentra en pequeñas proporciones y actúa sobre los extremos no reductores liberando unidades de glucosa. Tiene actividad sobre celulosa amorfa, celo-oligosacárido y CMC.

La β -glucosidasa hidroliza celobiosa y oligosacáridos de pequeño tamaño y es absolutamente necesaria para evitar la fuerte inhibición que sobre las endo y exoglucanasas produciría la celobiosa si se acumula en el medio de reacción.

Si se añaden celulasas al material lignocelulósico la hidrólisis de la celulosa es demasiado lenta, debido a la asociación de ésta con la lignina que constituye una barrera física a la penetración de las enzimas. Otros factores como la porosidad (área superficial accesible), la cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización y el contenido en lignina y hemicelulosa dificultan la accesibilidad de la celulasas reduciendo la eficiencia de la hidrólisis. Todos estos factores hacen necesaria una etapa de pretratamiento, previa a la hidrólisis de la celulosa, que altere la estructura del material lignocelulósico facilitando la acción de las enzimas [51].

1.11 BIOCOMBUSTIBLES

Existe una gran variedad de biocombustibles, de materias primas para su producción y de tecnología de procesos de diversos grados de alcance al mercado.

Para que efectivamente el uso de biocombustibles sea benéfico para la sociedad y para el medio ambiente, es necesario garantizar que:

- Contribuya al bienestar regional y nacional
- No impacte indebidamente a la calidad de aire, el agua y el suelo
- Reduzca realmente la emisión neta de gases de efecto invernadero

De acuerdo a la figura 19, la Agencia Internacional de la Energía, los beneficios en cuanto a la reducción de emisiones de gases invernaderos son significativos solo para el etanol a partir de caña de azúcar y biocombustibles de segunda generación. [20], [37].

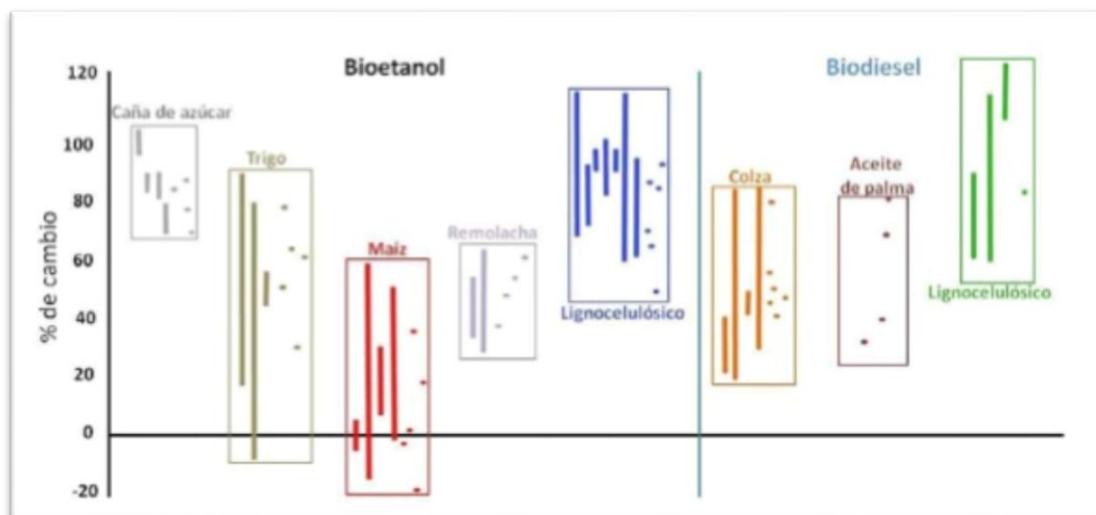


Figura 19: Porcentaje de cambio en las emisiones de gases de efecto invernadero para diferentes biocombustibles en comparación con los combustibles fósiles, (Eisentrut A. 2010, IAE, 2004).

1.11.1 BIOCMBUSTIBLES DE PRIMERA GENERACIÓN

Algunos de los insumos son de procedencia agrícola y están conformados por las partes alimenticias de las plantas, las cuales tienen un alto contenido de almidón, azúcares y aceites. Ejemplos de estas materias son el jugo de la caña de azúcar,

granos de maíz, jugo de la remolacha o betabel, aceite de semilla de girasol, aceite de soya, etc.

Los biocombustibles son producidos empleando tecnología convencional como la fermentación (para azúcares y carbohidratos), transesterificación (para los aceites y grasas), y la digestión anaerobia (para los desperdicios orgánicos). De estos procesos se obtiene etanol, metanol y n-butanol (a partir de azúcares), biodiesel (a partir de los aceites), y biogás (mezcla de metano y anhídrido carbónico, también conocidos como gas natural y dióxido de carbono respectivamente, obtenida a partir de los desperdicios orgánicos) [58].

1.11.2 BIOCOMBUSTIBLES DE SEGUNDA GENERACIÓN

Los insumos son residuos agrícolas y forestales compuestos principalmente por celulosa. Ejemplos de ellos son el bagazo de la caña de azúcar, el rastrojo de maíz (tallo, hojas y olote), paja de trigo, aserrín, hojas y ramas secas de árboles, etcétera.

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

Mediante los procesos de segunda generación se fabrica etanol, metanol, gas de síntesis (mezcla de anhídrido carbonoso, mejor conocido como monóxido de carbono, e hidrógeno), biodiesel, 2.5-dimetilfurano (DMF), entre otros.

1.11.3 BIOCOMBUSTIBLES DE TERCERA GENERACIÓN

Los insumos son vegetales no alimenticios de crecimiento rápido y con una alta densidad energética almacenada en sus componentes químicos, por lo que se les denomina “cultivos energéticos”. Entre estos vegetales están los pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido, y las algas verdes y verde azules [2].

2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1.1 MATERIA PRIMA

La materia prima se obtuvo en los mercados locales de la Ciudad de Morelia, limón de desecho, de estos separamos la cáscara y enseguida se exprimió el resto para extraer el jugo, el bagazo y la cáscara se secaron a 60 °C durante 24 horas en la estufa, se trituro en partículas con un diámetro menor a 0.5cm, se homogeneizó y se guardó en bolsas cerradas para evitar variación de la humedad durante la investigación.

2.1.2 MÉTODOS

- Determinación de humedad, método 7.005 (AOAC, 1984)
- Extracción de aceites, método reflujo equipo Soxhlet
- Extracción de Fenoles y flavonoides por Maceración y su cuantificación se realizó por un método colorimétrico modificado del ensayo Zhishen, Mengcheng y Jianming y el método espectrofotómetro desarrollado por Folin y Ciocalteu respectivamente.
- La sacarificación se llevó a cabo en dos partes, primero con una hidrólisis ácida y segundo con el residuo del primer paso se sometió a una digestión enzimática, su identificación y cuantificación se llevó a cabo mediante cromatografía (HPLC, Varían) con columna MetaCarb 87C y detector IR.

Las especificaciones del equipo utilizado son:

- ❖ Bomba cuaternaria Varían 350
- ❖ Detector diferencial de índice de refracción Varían 800

Las condiciones de operación utilizadas para el análisis fueron

- ❖ Régimen de elusión: isocrático
- ❖ Presión: entre 125 atm
- ❖ Caudal de fase móvil: agua
- ❖ Temperatura: 70 °C
- ❖ Volumen de inyección: 10 μ L
- ❖ Se obtienen óptimos mediante el método de superficie de respuesta con un diseño de experimentos factorial.

2.2 DIAGRAMA GENERAL DEL PROCESO

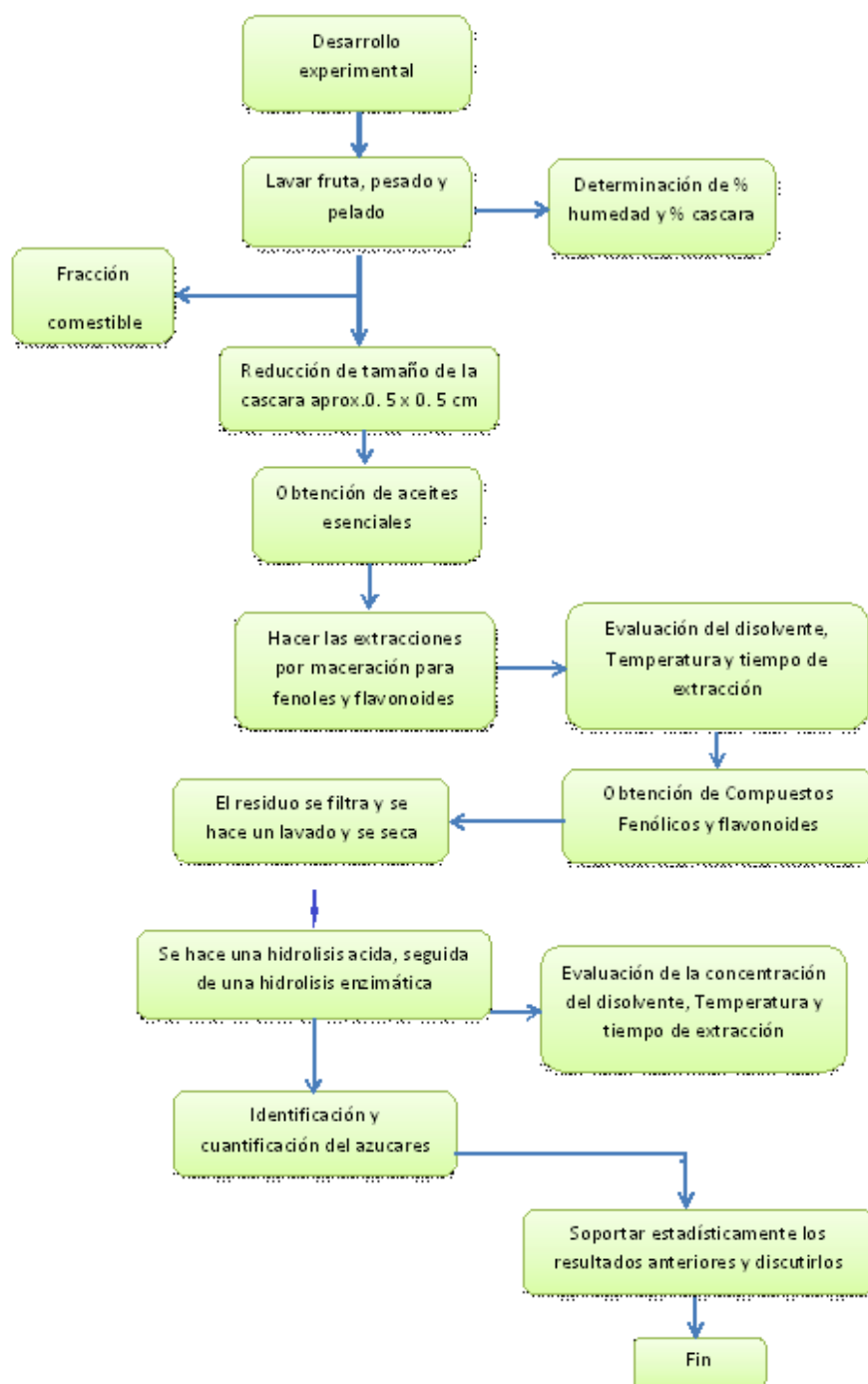


Figura 20: Diagrama general del proceso

2.3 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

2.3.1 Método, pérdida de peso por estufa

Este ensayo tiene por finalidad, determinar el contenido de humedad de una muestra, ya que todos los tejidos vegetales poseen agua ya sea en mayor o en menor proporción, la cual está formado por la suma de aguas libres, y/o ligada, la primera es la forma predominante y es liberada con gran facilidad, mientras que la segunda se encuentra combinada o absorbidas a las proteína.

El método empleado es el de pérdida de peso por estufa, de acuerdo a la NMX-F-083-1986.

Este método se basa en la pérdida de peso de la muestra por la evaporación del agua debido al calentamiento. Primero se hace el lavado de la materia prima, tomamos el peso de la capsula de porcelana considerando la calibración de la balanza analítica, del material tomamos muestras al azar de 100 g por triplicado y extraemos la cáscara, ver figura 21.



Figura 21: Cáscara de limón

Posteriormente pesamos la cantidad de cáscara obtenida de los 100g de limón, en las cápsulas, de igual manera obtenemos el porcentaje de bagazo y del jugo de limón, hacer cada uno por triplicado, enumerando las cápsulas para evitar confusión.



Figura 22: Cápsulas de porcelana en la estufa

Una vez teniendo la cáscara y el bagazo en las cápsulas y después de haberlas pesado y enumerado correctamente, se coloca en la estufa a 60 °C para no falsear la humedad en la muestra, ya que contiene cantidades de materia orgánica y compuestos volátiles que se pueden perder, Ver figura 22.

El tiempo de secado es un factor muy importante y varía dependiendo la muestra, se recomienda en este caso 24 horas, se saca la muestra y se enfría en el desecador por 25 min para evitar que tome humedad del medio después se pesa, se anota el peso y se repite el procedimiento cada hora hasta peso constante, el procedimiento es el mismo tanto para la cáscara como para el bagazo.

Los cálculos realizados para la determinación del contenido humedad por este método fue la expresión matemática siguiente:

$$\% \text{ humedad} = \frac{M_h - M_s}{M_r} \times 100$$

M_h = peso de la cápsula más la muestra húmeda (g.)

M_s = peso del cápsula más la muestra seca (g.)

M_r = peso de la cápsula (g.)

2.4 ACEITE ESENCIAL

Se retira la cáscara del fruto y del resto se extrae el jugo (bagazo), las cáscaras son sometidas a un lavado después de la extracción del jugo, seguida de una reducción de tamaño. Estas no pueden ser almacenadas ya que presentarán pérdida de compuestos importantes del aceite esencial, además que perderán consistencia por acción enzimática, afectando la calidad y rendimiento de este.

Para la extracción se utilizaron tres solventes, ciclohexano, hexano y agua, para identificar con cual se tiene el mejor rendimiento, una vez montado el equipo se procede a extraer en repetidas ocasiones (tres o dos o las veces que haya necesitado). La operación se llevó a cabo midiendo 150 ml de cada solvente y 50g de material, se hizo la extracción del aceite con cada uno de los solventes en el equipo soxhlet, excepto con el agua que se realizó por medio del método de arrastre de vapor, el montaje y el equipo se puede observar en la figura 23.

Se reúne el extracto y almacena, el solvente se separó posteriormente utilizando baño maría recuperando las cantidades de aceite esencial para su cuantificación.

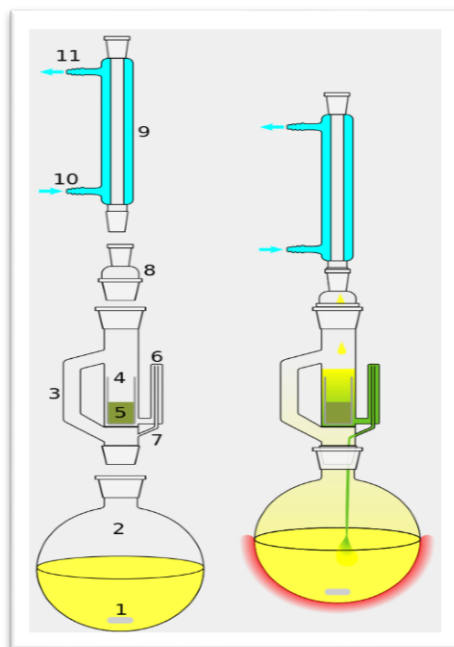


Figura 23: Equipo Soxhlet

2.5 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PARA FENOLES Y FLAVONOIDES.

2.5.1 Método de maceración

El material seleccionado es el limón en estado de maduración avanzado. Las frutas se lavaron con agua, se pesaron, se retiraron las cáscaras, se determinó el porcentaje de cáscara por cada 100 g de fruta y el contenido de humedad.

Las cáscaras se molieron en partículas pequeñas, se colocaron en frascos ámbar 10 g de cáscara y 50mL de etanol a diferentes concentraciones (70%, 80%, 90% V/V) (proporción cáscara/etanol 1:5), a diferentes temperaturas (30, 45, 60, 75) °C a tiempos diferentes (0, 12, 24) horas, estas fueron las condiciones predeterminadas de extracción. Posteriormente, se filtró para separar las cáscaras del extracto alcohólico, el cual fue utilizado para realizar las determinaciones posteriores.

2.5.2 CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR EL MÉTODO COLORIMÉTRICO DE FOLIN CIOCALTEU

El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato, usado para la determinación de antioxidantes fenólicos y polifenólicos. Funciona midiendo la cantidad de sustancia analizada que se necesita para inhibir la oxidación del reactivo. Esta es una estimación colorimétrica basada en la medición del color azul formado por la reducción del ácido fosfotungstomolibdico por los compuestos fenólicos en solución alcalina.

La concentración de fenoles totales se cuantificó utilizando el método descrito por Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. Se tomó 1 mL de cada extracto y se completó el volumen a 10 mL con etanol, se agregaron 2.25 mL del reactivo de Folin Ciocalteu (diluido 1:10 en agua destilada), se mezclaron los reactivos y se dejaron reposar de 5 a 8 minutos. Se agregaron 2.25 mL de una solución saturada de carbonato de sodio al 7% y después de 90 minutos se leyó la absorbancia a 760nm. Se realizó una curva tipo con ácido gálico tomando alícuotas de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, y 1.0 mL de una solución de ácido gálico (1 mL = 0.1 mg de ácido gálico) y se aplicó el mismo procedimiento que con los extractos. En la figura 24, se muestra el diagrama para dicho proceso. Los resultados obtenidos se reportan como g de ácido gálico equivalentes (GAE) por 100 g de cáscara base seca.

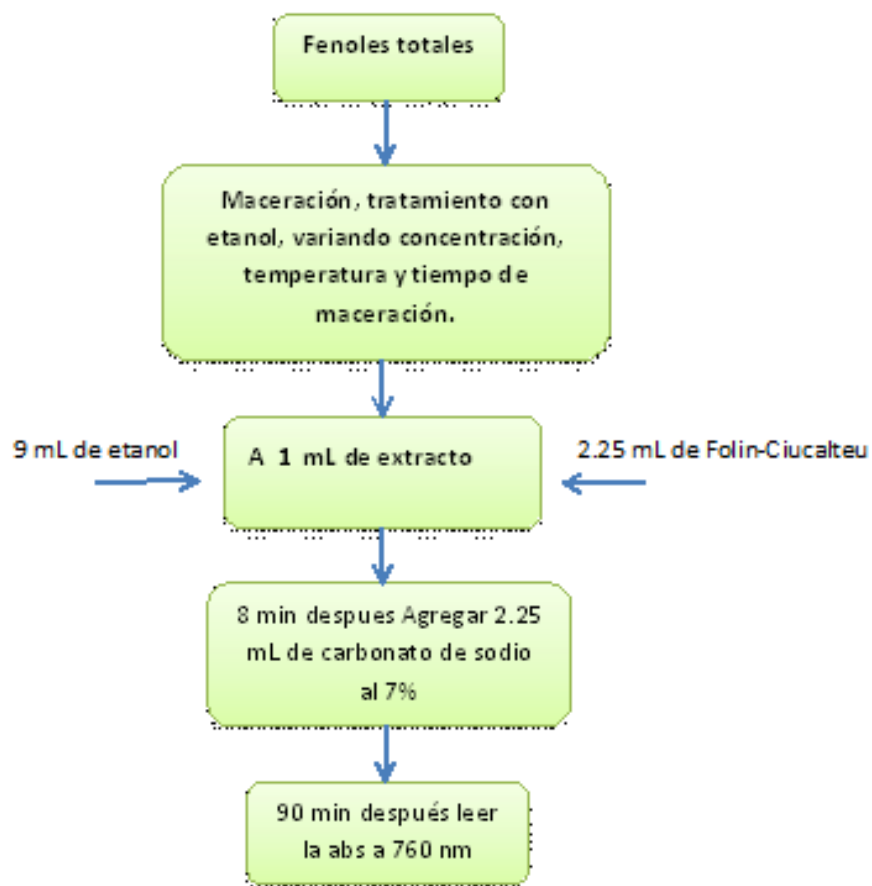


Figura 24: Diagrama para la obtención de los fenoles

2.5.3 DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES

Los flavonoides totales se cuantificaron por un método colorimétrico modificado del ensayo desarrollado por Zhishen, Mengcheng y Jianming, el diagrama del proceso se muestra en la figura 25. De la solución diluida que contiene flavonoides se tomó (1mL), se agregó NaNO_2 (0.7mL) a 5%(W/W) y (10mL) de etanol al 30%(V/V), se mezclaron durante 5 minutos y después se añadió (0.7mL) de AlCl_3 al 10%(W/W), se mezclaron completamente, 6 minutos más tarde se añadió (5mL) de NaOH (1 mol/L), después la solución se diluyó a 25mL con etanol al 30%(V/V), midiéndose la absorbancia a 430

nm en un espectrofotómetro después de haberse dejado reposar la mezcla por 10 minutos.

Se presentó gráficamente una curva estándar utilizando quercetina. A diferentes concentraciones de quercetina se preparó en etanol al 80%(V/V) y se leyó su absorbancia a 430 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se representaron como mg de quercetina/ g de peso seco por comparación con la curva estándar de la quercetina.

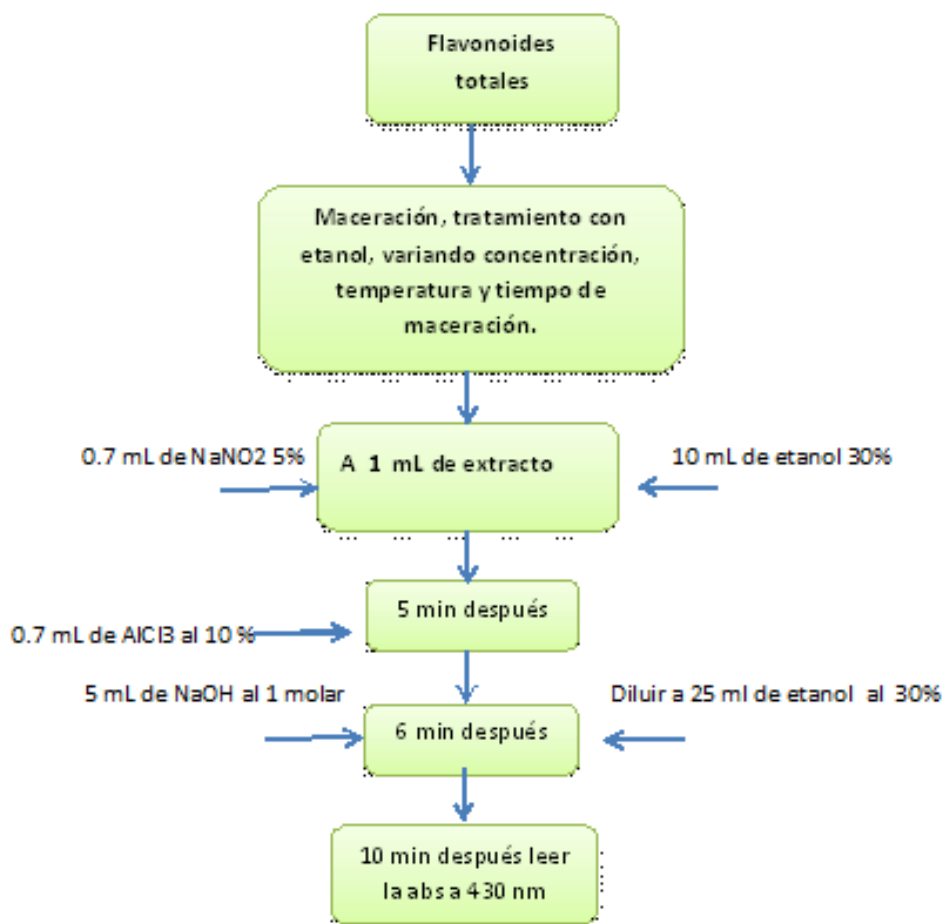


Figura 25: Diagrama para la obtención de los flavonoides

2.5.4 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA COMPUESTOS FENÓLICOS Y FLAVONOIDES TOTALES

La experimentación se llevó a cabo de acuerdo a un diseño factorial multinivel tal como se muestra en la tabla 6, en donde se reporta lo siguiente: la cantidad de materia orgánica que se mantuvo constante en cada una de las pruebas e igual a 10g. Se manejan 3 variables independientes, concentración del solvente (etanol/agua), temperatura y tiempo de maceración. La variable de respuesta (dependiente) es la cantidad de fenoles totales y flavonoides totales reportados en mg/g de material b.s.

Tabla 6: Factores experimentales para la creación de la matriz de diseño de experimentos para fenoles y flavonoides

Variables fijas	nomenclatura	unidades	Niveles
Cantidad de materia orgánica		g	10
Variables independientes			
Concentración de solvente	C _s	%(V/V)	70, 80, 90
Temperatura	T	°C	30, 45, 60, 75
Tiempo	t	h	0, 12, 24
Variables dependientes			
Fenoles totales	FN _T	mg/g materia b.s.	
Flavonoides totales	FL _T	mg/g materia b.s.	

Se utilizó el software, Statgraphics X64, para realizar el diseño de experimentos indicado.

2.6 SACARIFICACIÓN DEL RESIDUO

2.6.1 SACARIFICACIÓN DEL LIMÓN

La sacarificación del material lignocelulósico se llevó a cabo mediante dos pasos como se muestra en la figura 26, la primera, se llevó a cabo una hidrólisis química con ácido sulfúrico como catalizador en un reactor autoclave a condiciones de operación establecidas, los hidrolizados se filtraron y los azúcares obtenidos fueron determinados por HPLC. El residuo sólido se lavó con agua destilada y se dejó secar hasta peso constante para posteriormente hacer una hidrólisis enzimática utilizando una mezcla de enzimas comerciales diluidas con una solución buffer de acetatos a 50 mili molar de pH igual a 4.5, los hidrolizados obtenidos de igual manera se determinaron por medio del HPLC.

Para la identificación de los azúcares presentes en el limón estudiado, se realizaron estándares de los siguientes monómeros, Arabinosa, Fructosa, Glucosa, Manosa y Xilosa, prepararon soluciones patrones individuales con estos azúcares para así determinar el tiempo de retención en cada uno de ellos y por comparación, cuantificar las muestras obtenidas.

Las muestras preparadas se inyectaron al cromatógrafo VARIAN Star 800 modelo 410 con detector de índice de refracción realizando una curva de calibración obteniéndose una muy buena resolución en estos picos, como fase móvil se utilizó agua grado HPLC y un flujo de 1 ml/min con una presión aproximada de 123-130 atm, una temperatura de 70 °C y un volumen de inyección de 10 μ L. El tiempo total de los cromatogramas fue de 35 min en estas condiciones, utilizando una columna MetaCarb 87C que contiene resina de poliestireno sulfonado, una longitud de 150mm con diámetro interno de 4.6mm y diámetro externo de 1/4 cm, recomendada para la separación de carbohidratos.

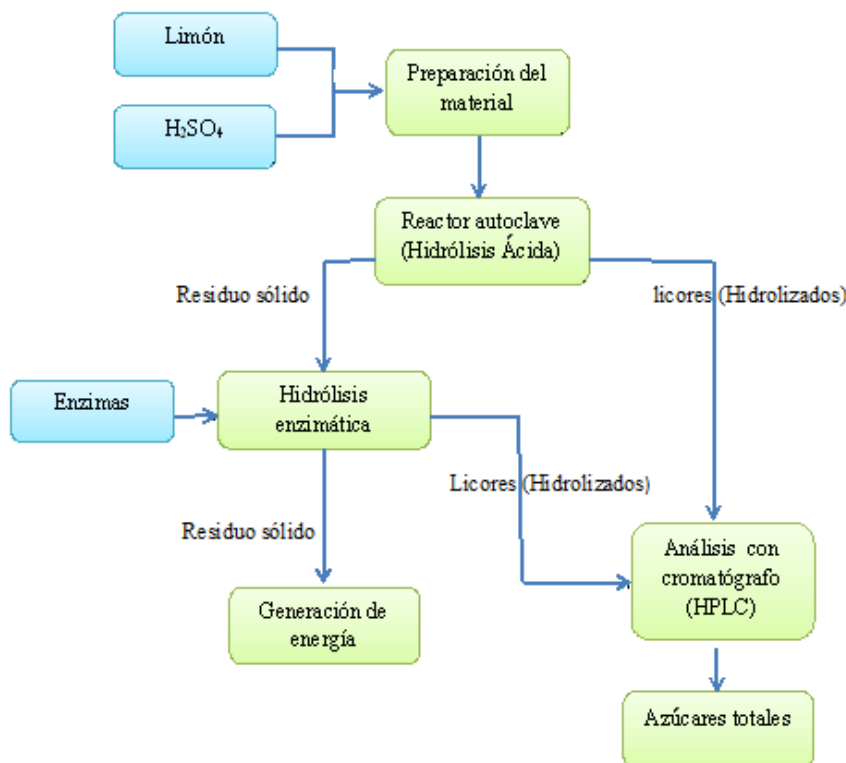


Figura 26: Sacarificación del limón

2.6.2 HIDRÓLISIS ÁCIDA

Se estudiaron tres variables para obtener las condiciones óptimas para la obtención del hidrolizado en el autoclave: concentración de ácido, temperatura y tiempo de hidrolizado. Se utilizó ácido sulfúrico en concentraciones de 1, 2 y 3 % y temperaturas de 110, 120 y 130 °C, en diferentes tiempos de hidrolizado los cuales son 0, 15 y 30 min. Los hidrolizados se obtuvieron con 50g de mezcla en el cual se encuentra (ácido, agua y bagazo de limón), manteniendo una relación 1/10 de sólido/líquido. La fracción líquida estuvo compuesta por el peso correspondiente de ácido y del agua. La fracción sólida correspondió solo a los gramos de materia seca que aporta la cáscara limón.

Las muestras se pesaron y se colocaron en una autoclave, transcurrido el tiempo, los hidrolizados se filtraron y los licores obtenidos se analizaron en el HPLC.

2.6.3 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES

Con objeto de optimizar el proceso, la experimentación se llevó a cabo de acuerdo a un diseño factorial multinivel tal como se muestra en la tabla 7, en donde se reporta lo siguiente: la cantidad de material. Se manejan 3 variables independientes, concentración del ácido sulfúrico, Temperatura y tiempo de hidrólisis. La variable de respuesta (dependiente) es la concentración de azúcares reportadas en g/L.

Tabla 7: Factores experimentales para la creación de la matriz de diseño de experimentos para etanol, hidrólisis ácida.

Variables fijas	nomenclatura	unidades	Niveles
Cantidad de sustratos		g	5.1
Variables independientes			
Concentración de ácido	C_A	%(P/P)	1, 2, 3
Temperatura	T	°C	110, 120, 130
Tiempo	t	min	0, 15, 30
Variables dependientes			
Concentración de azúcares	C_{AF}	g/L	

Para esto se utilizó el software, Statgraphics X64, para realizar el diseño de experimentos indicado.

2.6.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

El residuo proveniente de la hidrólisis química se sometió a una digestión enzimática figura 27, para lo cual se utilizó una mezcla de celulasas comerciales, Celluclast 1.5 L (Celulasas de *Trichoderma reesei*) (provenientes de *Aspergillus niger*) y β -Glucosidasas, Novozyme 188, (provenientes de *Aspergillus niger*).

Las condiciones en las que se llevó a cabo estos experimentos fueron 50°C, con una solución buffer de acetatos con un pH de 4.5 al cual se le agregaron las enzimas comerciales (Celluclast y Novozyme 188) y 10 % de material seco de muestras (1gr), se llevó a un tiempo máximo de 120 Horas muestreando en tiempos intermedios.

Las muestras se filtraron con un filtro de 0.2 μ y se analizaron en HPLC para determinar los azúcares fermentables obtenidos con la digestión.



Figura 27: Hidrólisis enzimática

2.6.5 Análisis y preparación de Hidrolizados

Los hidrolizados de los casos referidos anteriormente, hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática, se diluyeron en una proporción de 1/10 con agua destilada para después centrifugar por tres minutos estas muestras, enseguida se filtraron a través de una membrana de 0.2 micras de diámetro de poro los cuales se analizan por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), de esta manera podemos conocer las concentraciones de los azúcares obtenidos por comparación con los estándares antes realizados.

2.7 DETERMINACIÓN DE LA LIGNINA

El peso del residuo insoluble que queda tras la hidrólisis ácida se denomina lignina de Klason.

El precipitado se filtra a través de crisoles de placa filtrante con tamaño de poro N° 3 de peso seco conocido, se lava con agua y se mantiene en la estufa a 60 °C durante 24 hrs. Transcurrido el tiempo se retira, se enfrían en un desecador conteniendo gel de sílice y se determina su peso.

El contenido porcentual en lignina de Klason en base seca (LK) se calcula según la siguiente ecuación:

$$LK = \frac{W_r}{W_h(1 - H)} \times 100$$

Dónde:

W_r = peso en gramo de residuo seco

W_h = peso inicial total de la muestra antes de la HAC (g de muestra húmeda)

H = humedad de la muestra.

3 RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

MATERIA PRIMA

Al limón de desecho se le separó la cáscara y se exprimió obteniendo 45% en peso de jugo, el peso de la cáscara es el 18.61%. El bagazo y la cáscara se secaron y molieron hasta un diámetro promedio de 0.5 cm (malla universal no. 40), se homogeneizó y guardó en bolsas cerradas para evitar variación de la humedad durante la experimentación. Los resultados los observamos en la tabla siguiente.

3.1 HUMEDAD

La humedad se determinó exprimiendo el limón primero y posteriormente se secó tanto el bagazo como la cáscara obteniendo los resultados que se reportan en la tabla no. 8

Tabla 8: Resultados materia prima

	% Peso	% Humedad	Desviación estándar
Cáscara	18.61	76.87	0.9761
Bagazo	26.39	86.17	0.2524

3.2 ACEITE ESENCIAL

La experimentación se realizó con limón en estado avanzado de maduración, los residuos de la materia prima utilizada se desecharon. La extracción del aceite esencial se realizó como se describe en la metodología, utilizando tres solvente, ciclohexano, hexano y agua [12] [29] [47].

Los experimentos se realizaron por triplicado con cada uno de los solventes en los cuales se utilizó 150 ml, con una muestra de materia prima igual a 50 gramos para cada extracción, el solvente se separó posteriormente utilizando baño maría, recuperando las cantidades obtenidas de aceite esencial reportando en la tabla 9 un promedio de estas cantidades.

En la figura 28 se observa el equipo utilizado para la separación del solvente.



Figura 28: Separación de solvente del aceite esencial mediante el baño maría

La tabla 9 muestra los resultados que se obtienen reportando el promedio de tres experimentos.

De acuerdo con estos resultados, podemos observar que el hexano tiene un mejor rendimiento.

Tabla 9: Aceite esencial obtenido

Solvente	Aceite Esencial
Ciclohexano	1.70 g.
Hexano	2.38 g.
Agua	1.02 g.

La composición del aceite esencial se tomó de bibliografía reportándose en la tabla 10. [19]

Tabla 10: Composición del aceite esencial del limón.

Componentes del aceite esencial del limón			
pico	Identificación probable	Tiempo de retención	Área %
1	Alfa tujeno y alfa pineno	8.529	1.82
2	Campeno	8.623	
3	Sabineno y beta pineno	9.784	19.83
4	Limoneno	11.75	63.20
5	terpineno	13.54	10.15
6	Terpinoleno	13.97	0.42
7	Linalool	14.85	0.21

Referencia: Contreras et al., 1980).

3.3 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES Y FLAVONOIDES TOTALES

Se realizaron curvas estándar de ácido gálico la cual utilizamos para cuantificar el contenido fenólico de los extractos de las cáscaras, de igual manera se realizó una curva estándar de quercetina para cuantificar el contenido de flavonoides.

3.3.1 DISEÑO DE EXPERIMENTOS UTILIZADO PARA LA OBTENCIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES

Se realizó un diseño de experimentos factorial multinivel, con tres variables, temperatura, tiempo y concentración del solvente, las variables respuesta fueron fenoles y flavonoides, las cuales se reportaron en la tabla 11 como mg de ácido gálico/g de muestra b.s. y mg de quercetina/g de muestra b.s. respectivamente.

En la siguiente tabla se muestra la matriz de experimentación del presente diseño.

Tabla 11: Matriz experimental y resultados de obtención de fenoles y flavonoides

fila	block	Temperatura (°C)	concent. De solv. % vol.	tiempo (hrs)	Fenoles mg de ácido gálico /g b.s	flavonoides mg de quercetina/ g b.s
1	1	30	70	0	0	0
2	1	45	70	0	0	0
3	1	60	70	0	0	0
4	1	75	70	0	0	0
5	1	30	80	0	0	0
6	1	45	80	0	0	0
7	1	60	80	0	0	0
8	1	75	80	0	0	0
9	1	30	90	0	0	0
10	1	45	90	0	0	0
11	1	60	90	0	0	0
12	1	75	90	0	0	0
13	1	30	70	12	1,4705	1,3103
14	1	45	70	12	1,5455	1,4041
15	1	60	70	12	1,3246	1,602
16	1	75	70	12	1,4934	1,6556
17	1	30	80	12	2,6517	1,3577
18	1	45	80	12	3,7225	1,5567
19	1	60	80	12	1,7434	1,7268

20	1	75	80	12	3,5538	3,3804
21	1	30	90	12	1,9975	0,7783
22	1	45	90	12	1,4309	1,2103
23	1	60	90	12	1,5767	1,2041
24	1	75	90	12	1,6913	3,2896
25	1	30	70	24	1,708	2,0412
26	1	45	70	24	1,8038	1,7804
27	1	60	70	24	1,3371	1,4515
28	1	75	70	24	2,095	2,0938
29	1	30	80	24	2,9413	0,3278
30	1	45	80	24	1,4975	1,8969
31	1	60	80	24	1,9746	2,0175
32	1	75	80	24	3,3496	2,5577
33	1	30	90	24	1,5955	0,3896
34	1	45	90	24	1,1642	1,5175
35	1	60	90	24	1,6142	1,6835
36	1	75	90	24	2,2663	2,5268
37	2	30	70	0	0	0
38	2	45	70	0	0	0
39	2	60	70	0	0	0
40	2	75	70	0	0	0
41	2	30	80	0	0	0
42	2	45	80	0	0	0
43	2	60	80	0	0	0
44	2	75	80	0	0	0
45	2	30	90	0	0	0
46	2	45	90	0	0	0
47	2	60	90	0	0	0
48	2	75	90	0	0	0
49	2	30	70	12	1,983	1,4061
50	2	45	70	12	1,7809	1,3917
51	2	60	70	12	1,6496	1,8372
52	2	75	70	12	1,6371	1,2773
53	2	30	80	12	2,633	1,1762
54	2	45	80	12	3,4392	1,8597
55	2	60	80	12	1,8225	1,6092
56	2	75	80	12	3,3121	3,3927
57	2	30	90	12	1,8559	0,1237
58	2	45	90	12	1,5705	1,1515

59	2	60	90	12	1,3705	1,3546
60	2	75	90	12	1,7517	3,0628
61	2	30	70	24	1,9059	2,8453
62	2	45	70	24	1,5517	1,9865
63	2	60	70	24	1,3288	1,7969
64	2	75	70	24	2,185	2,4649
65	2	30	80	24	2,7913	0,4391
66	2	45	80	24	1,5434	2,0103
67	2	60	80	24	1,6809	2,0845
68	2	75	80	24	3,2746	2,6505
69	2	30	90	24	1,808	0,4474
70	2	45	90	24	1,108	1,7525
71	2	60	90	24	1,5101	1,4979
72	2	75	90	24	2,3705	2,3835

En la tabla 11 se marcaron con amarillo las condiciones en las cuales encontramos un mejor resultado en la obtención de fenoles al igual que sus cantidades obtenidas, mientras que los de color verde son los resultados en los que se reporta una mayor concentración de flavonoides.

Este método permite obtener las condiciones óptimas en la obtención de estos compuestos como se muestra en las siguientes figuras.

3.3.2 GRÁFICOS Y RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA EXPERIMENTACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE LOS FENOLES

Se condensaron los resultados anteriores en las tablas 12 y 13 y podemos decir, en base al método de superficie de respuesta utilizado, que las condiciones de reacción en las que se encontró un mayor contenido de fenoles es a una temperatura de 45 °C con una concentración del 80% de etanol/agua y un tiempo de reacción de 12 horas, en la figura 29 se muestran graficados estos resultados, mostrando los puntos en los que se encontró un mayor contenido de fenoles.

Tabla 12: Concentración de fenoles expresados en **mg de ácido gálico / g de cáscara b.s**

Tiempo de Reacción (hrs)	30 °C			45 °C		
	etanol 70 %	etanol 80%	etanol 90%	etanol 70 %	etanol 80%	etanol 90%
0	0	0	0	0	0	0
12	1.725	2.642	1.926	1.6632	3.580	1.500
24	1.806	2.869	1.701	1.677	1.520	1.136

Tabla 13: Concentración de fenoles expresados en **mg de ácido gálico / g de cáscara b.s**

Tiempo de reacción (hrs)	60 °C			75 °C		
	etanol 70 %	etanol 80%	etanol 90%	etanol 70 %	etanol 80%	etanol 90%
0	0	0	0	0	0	0
12	1.4871	1.735	1.473	1.565	3.432	1.721
24	1.332	1.850	1.562	2.140	3.3121	2.328

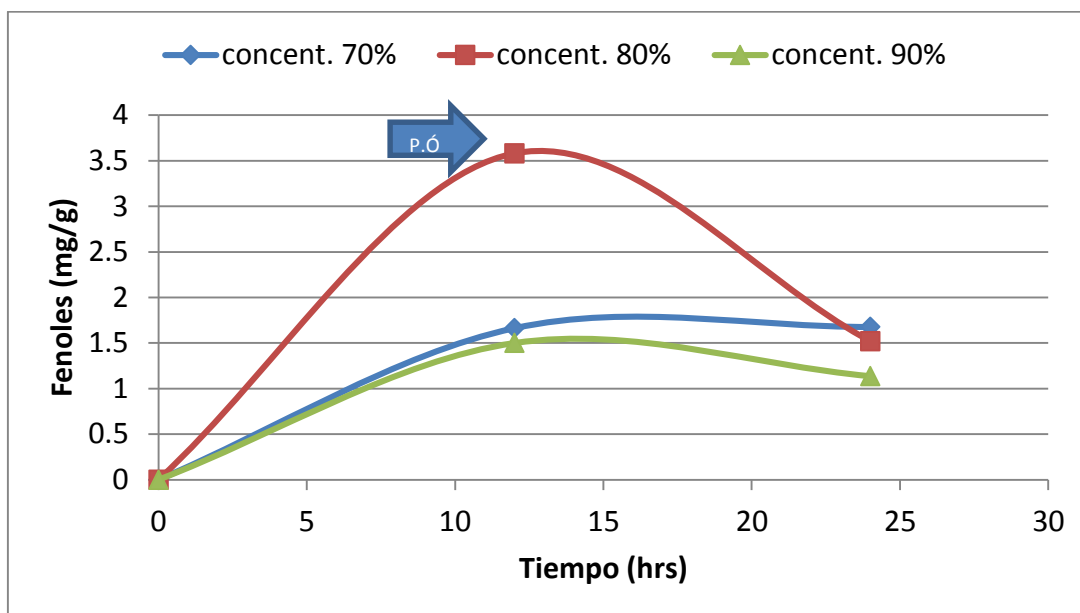


Figura 29: Obtención de fenoles a $T = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$

En la tabla 14 se muestra el análisis de varianza y posteriormente los gráficos correspondientes a esta experimentación.

Tabla 14: Análisis de varianza de los fenoles

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Temp.	7.7708	1	7.7708	35.30	0.0000
B:Conc. Solv.	0.0260447	1	0.0260447	0.12	0.7321
C:Tiempo	41.0798	1	41.0798	186.59	0.0000
AA	0.440375	1	0.440375	2.00	0.1624
AB	0.00192157	1	0.00192157	0.01	0.9259
AC	3.07137	1	3.07137	13.95	0.0004
BB	1.77358	1	1.77358	8.06	0.0062
BC	0.0988457	1	0.0988457	0.45	0.5054
CC	16.817	1	16.817	76.38	0.0000

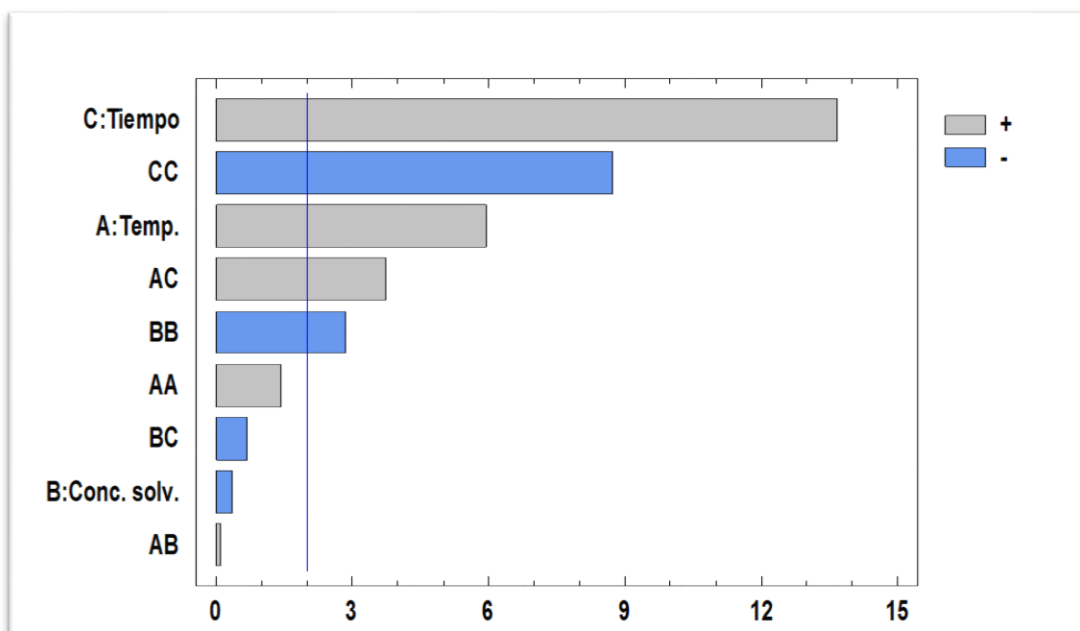


Figura 30: Diagrama de Pareto para los fenoles totales, efecto estandarizado

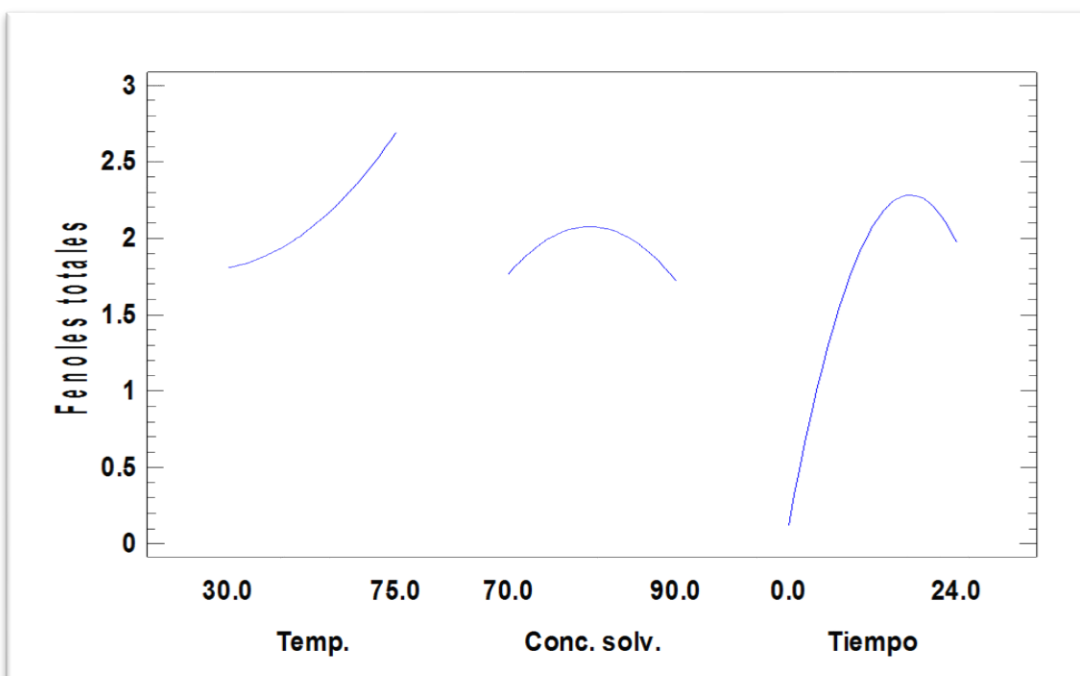


Figura 31: Comportamiento de las variables para la obtención de fenoles totales

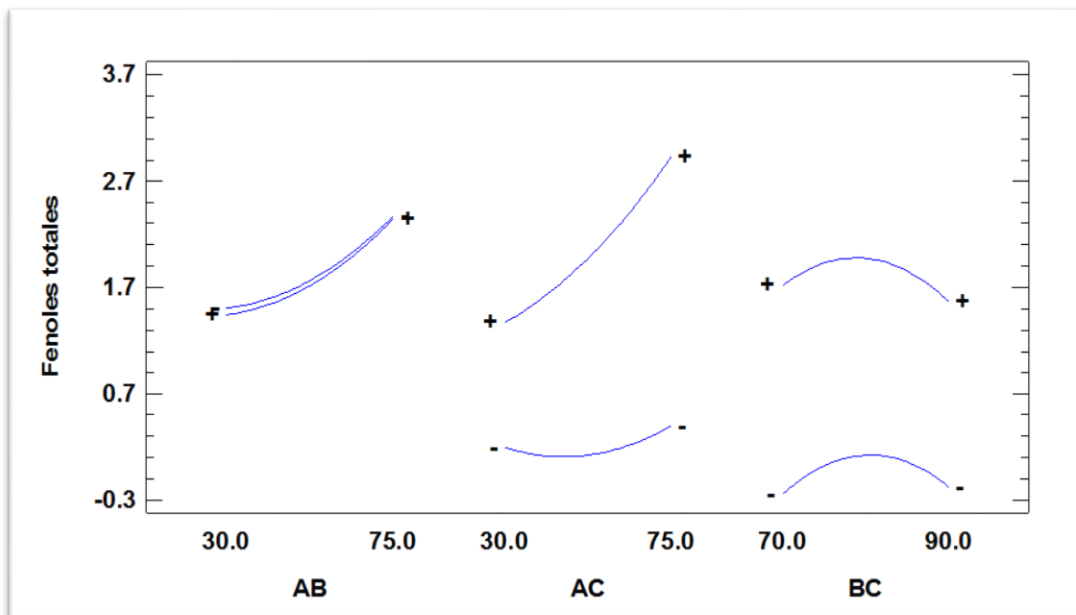


Figura 32: Interacción de las variables en la obtención de fenoles

La superficie de respuesta que representa los datos experimentales y que se observa en el gráfico no. 33 es la siguiente.

$$\begin{aligned} \text{Fenoles totales} = & -20.5623 - 0.0350088 * \text{Temp.} + 0.533951 * \text{Conc.solv.} + \\ & 0.219024 * \text{T tiempo} + 0.000347586 * \text{temp.}^2 + 0.0000377278 * \text{Temp.} * \\ & \text{Conc.solv.} + 0.00125695 * \text{Temp.} * \text{T tiempo} - 0.0033294 * \text{Conc.solv.}^2 - \\ & 0.000463151 * \text{Conc.solv.} * \text{T tiempo} - 0.00711955 * \text{T tiempo}^2 \end{aligned}$$

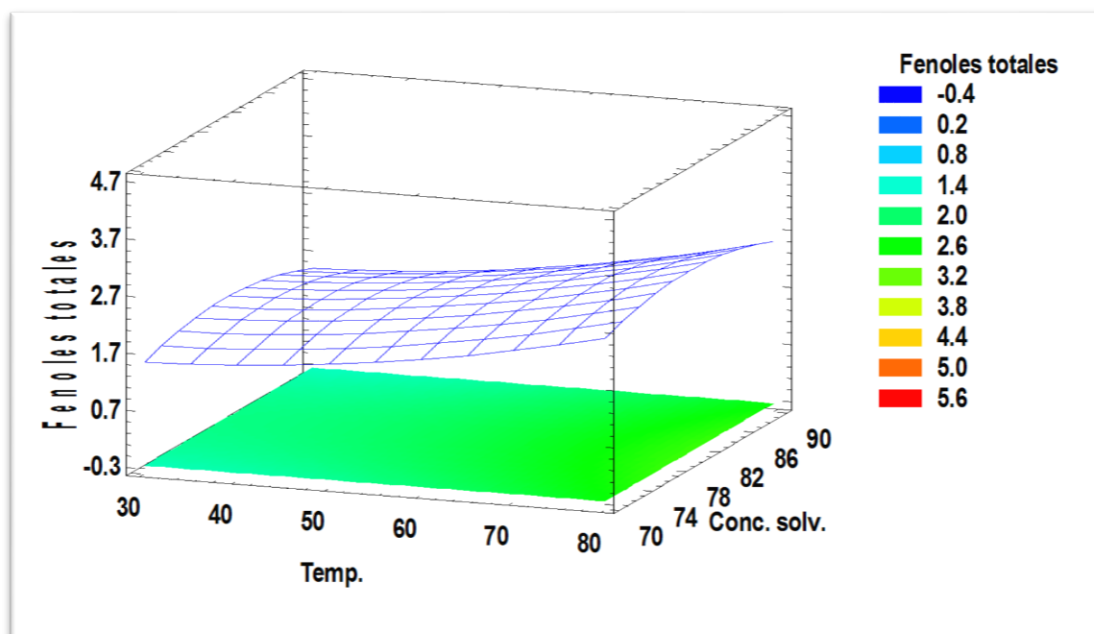


Figura 33: Superficie de respuesta de fenoles

3.4 OBTENCIÓN DE FLAVONOIDES

En la tabla 15 y 16 se muestran un promedio de los resultados para flavonoides.

Tabla 15: Concentración flavonoides expresados en **mg de quercetina/ g de cáscara b.s**

Tiempo de Reacción (hrs)	30 °C			45 °C		
	70 % etanol	80% etanol	90% etanol	70 % etanol	80% etanol	90% etanol
0	0	0	0	0	0	0
12	1.358	1.266	0.451	1.397	1.708	1.180
24	2.443	0.383	0.418	1.883	1.953	1.635

Tabla 16: Concentración flavonoides expresados en **mg de quercetina/ g de cáscara b.s**

Tiempo de reacción (hrs)	60 °C			75 °C		
	70 % etanol	80% etanol	90% etanol	70 % etanol	80% etanol	90% etanol
0	0	0	0	0	0	0
12	1.719	1.668	1.279	1.466	3.386	3.176
24	1.624	2.051	1.590	2.278	2.604	2.455

Los mejores resultados, de acuerdo a la tabla anterior, fue a los 75 °C a un tiempo de 12 horas y una concentración del 80% de etanol/agua, muy semejante a la obtención de los fenoles, en la figura 34 se muestran graficados estos resultados, mostrando los puntos en los que encontramos una mayor concentración de flavonoides, mientras que en la tabla 17 se muestra el análisis de varianza.

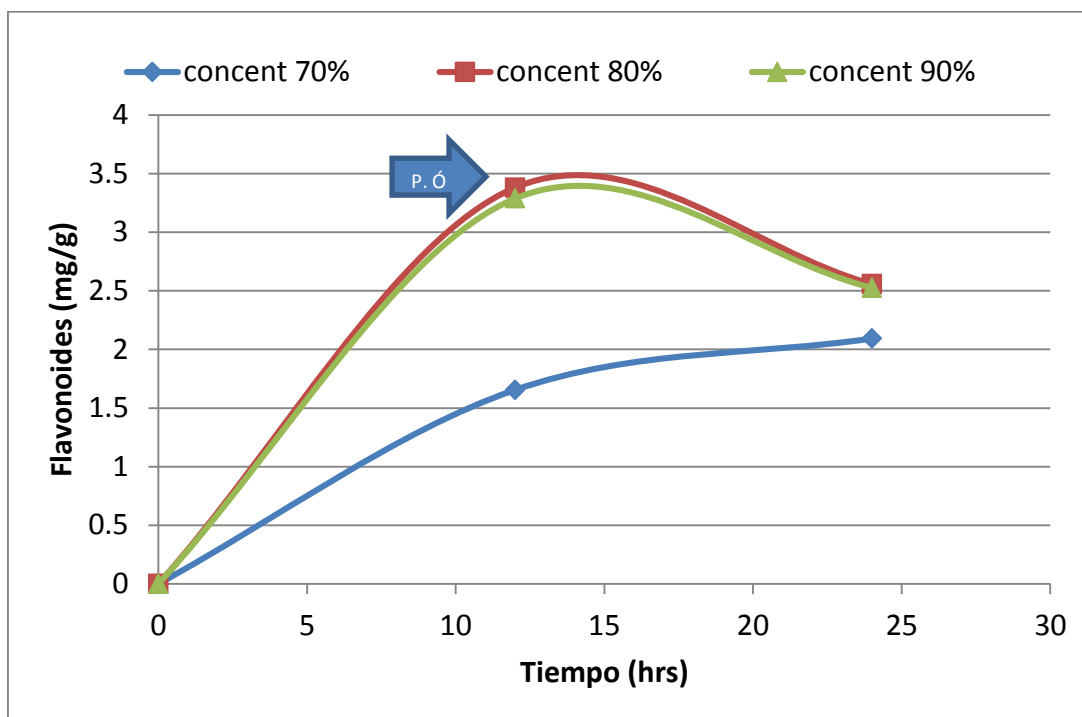


Figura 34: Obtención de flavonoides a T= 75 °C

Tabla 17: Análisis de varianza para los flavonoides

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Temp.	8.20262	1	8.20262	45.14	0.0000
B:Conc. Solv.	0.281474	1	0.281474	1.55	0.2180
C:Tiempo	38.4281	1	38.4281	211.49	0.0000
AA	0.361108	1	0.361108	1.99	0.1637
AB	2.12322	1	2.12322	11.69	0.0011
AC	2.37252	1	2.37252	13.06	0.0006
BB	0.178119	1	0.178119	0.98	0.3260
BC	0.49166	1	0.49166	2.71	0.1051
CC	11.8385	1	11.8385	65.15	0.0000

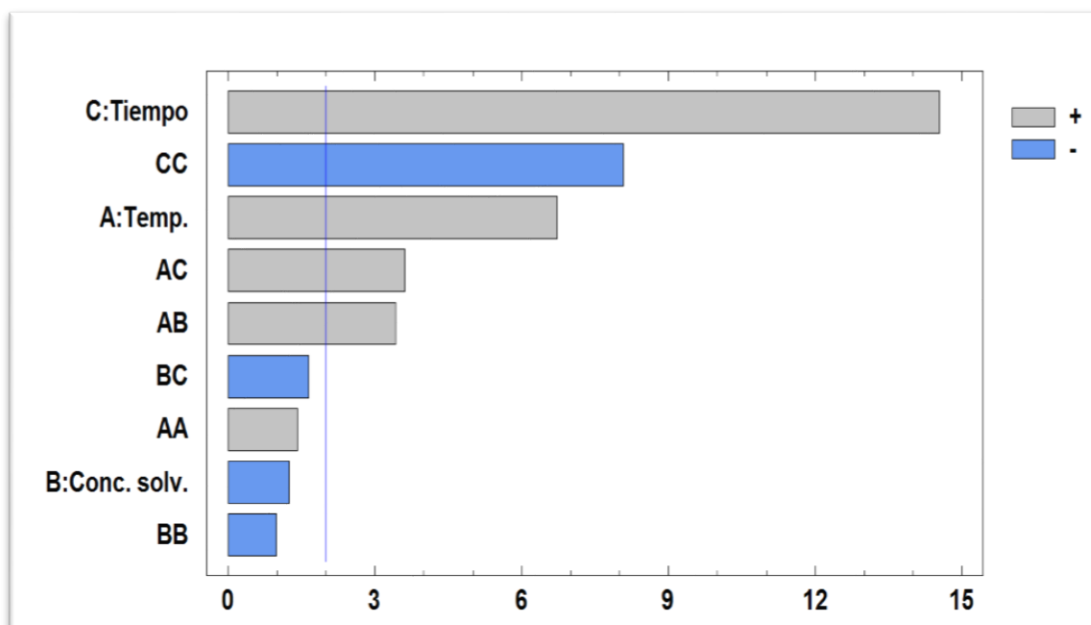


Figura 35: Diagrama de Pareto para la obtención de flavonoides, efecto estandarizado

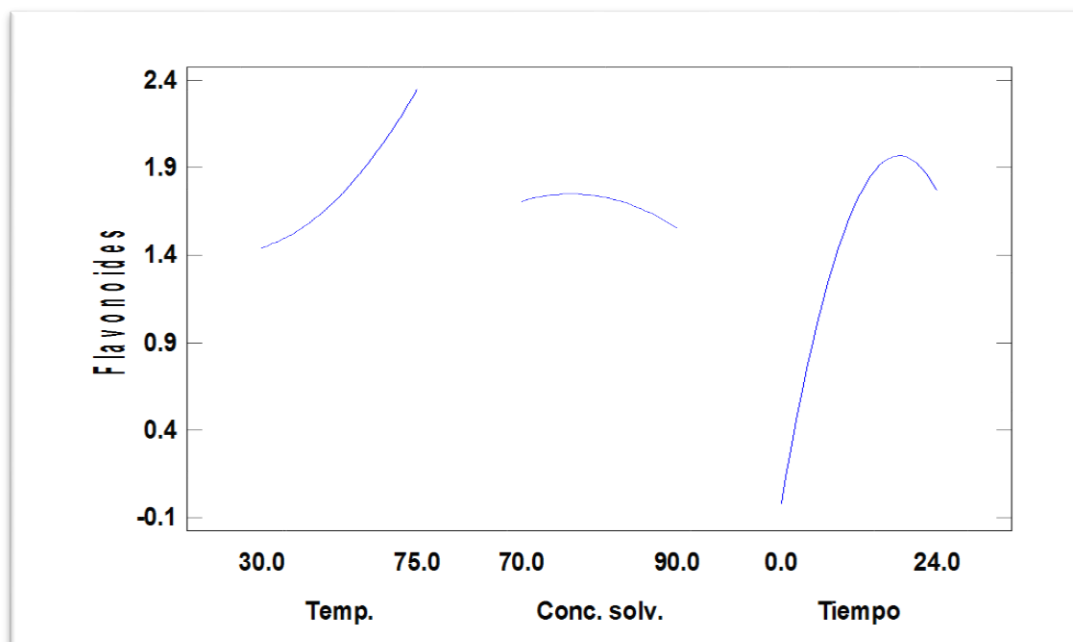


Figura 36: Comportamiento de las variables en la obtención de flavonoides

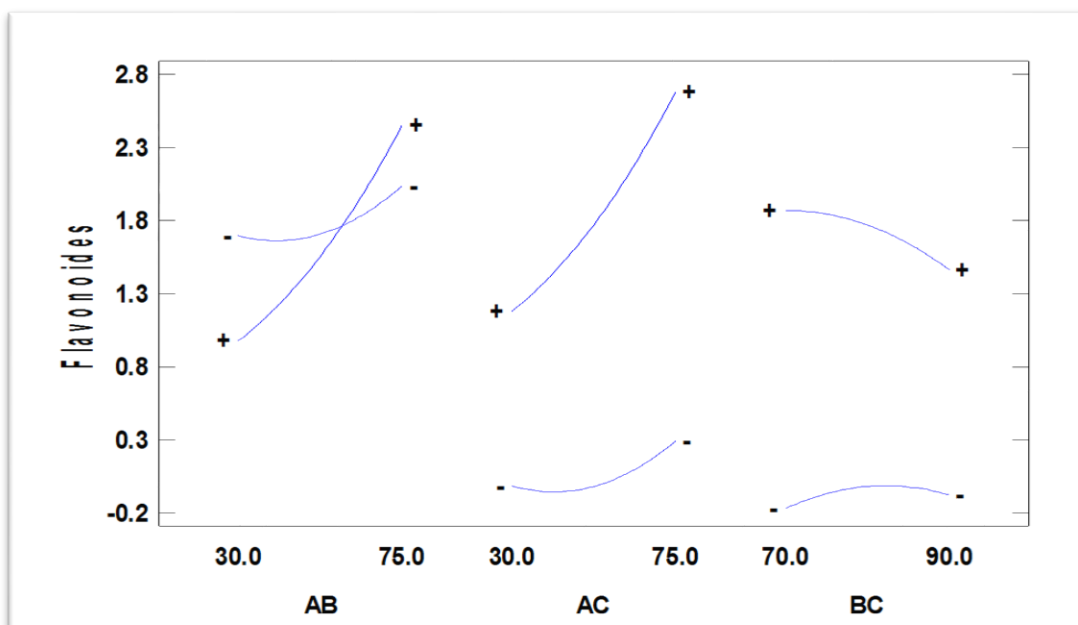


Figura 37: Interacción de las variables en la obtención de flavonoides

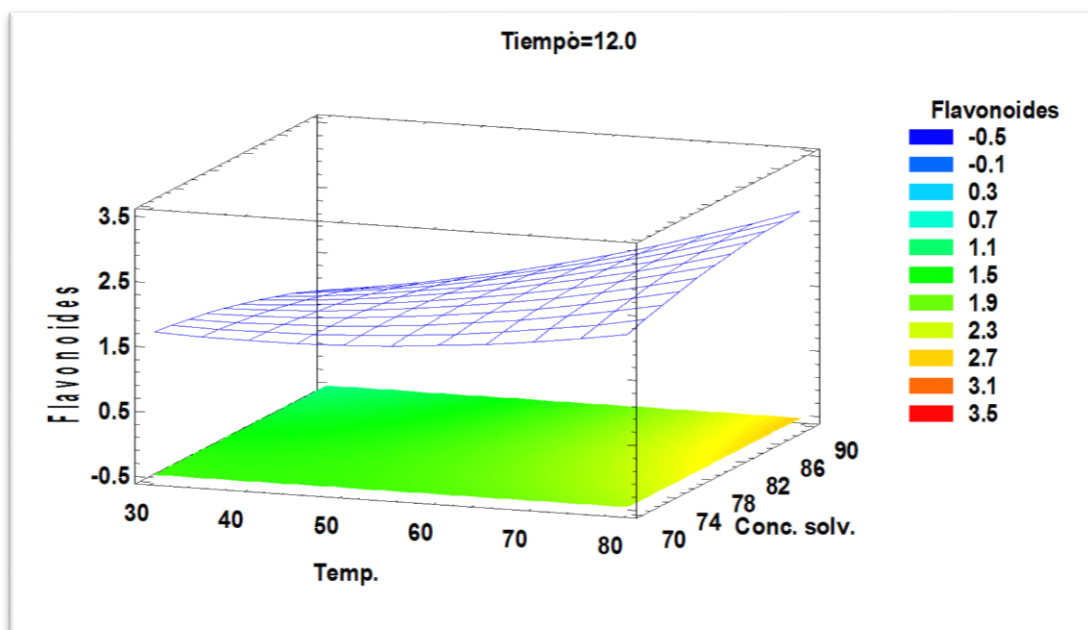


Figura 38: Superficie de respuesta en la obtención de flavonoides

La ecuación correspondiente a la superficie de respuesta graficado anteriormente es la siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Flavonoides} = & - 1.37577 - 0.126507 * \text{Temp.} + 0.107714 * \text{Conc.solv.} + 0.242563 \\ & * \text{Tiempo} + 0.000314753 * \text{Temp.}^2 + 0.00125409 * \text{Temp.} * \text{Conc.solv.} + \\ & 0.00110473 * \text{Temp.} * \text{Tiempo} - 0.0010551 * \text{Conc.solv.}^2 - 0.00103294 * \\ & \text{Conc.solv.} * \text{Tiempo} - 0.00597347 * \text{Tiempo}^2 \end{aligned}$$

3.5 SACARIFICACIÓN DEL RESIDUO

El residuo obtenido después de la extracción de aceites esenciales, fenoles y flavonoides, se llevó a un proceso de sacarificación con objeto de romper los polímeros, hemicelulosa y celulosa y obtener sus monómeros, los cuales en paso posterior, se pueden utilizar para la obtención de bioetanol de segunda generación.

En el presente trabajo, únicamente se sacarificó el material quedando para trabajos posteriores la obtención del bioetanol.

La sacarificación se realizó en dos pasos:

Primero con una hidrólisis ácida y el residuo de ésta a una hidrólisis enzimática.

3.5.1 DISEÑO DE EXPERIMENTO, HIDRÓLISIS ÁCIDA

El primer paso en la sacarificación, se llevó a cabo una hidrólisis ácida, para esto se realizó un diseño de experimentos factorial multinivel, con tres variables, temperatura, tiempo y concentración de ácido, la variable respuesta fue azúcares fermentables y estos estuvieron reportados en g/L, los resultados se muestran en la tabla 18.

Tabla 18: Matriz experimental y resultados de obtención de azúcares en la hidrólisis ácida

Fila	Block	Temperatura (°C)	Concentración (% p)	Tiempo (min)	Azúcares (g/L)
1	1	110	1	0	0
2	1	120	1	0	0
3	1	130	1	0	0
4	1	110	2	0	0
5	1	120	2	0	0
6	1	130	2	0	0
7	1	110	3	0	0
8	1	120	3	0	0
9	1	130	3	0	0
10	1	110	1	15	2.65644
11	1	120	1	15	8.66739
12	1	130	1	15	9.67330
13	1	110	2	15	5.52278
14	1	120	2	15	14.47234
15	1	130	2	15	19.865
16	1	110	3	15	13.2258
17	1	120	3	15	18.2322
18	1	130	3	15	25.7392
19	1	110	1	30	5.04298
20	1	120	1	30	10.09344
21	1	130	1	30	15.3854
22	1	110	2	30	16.6307
23	1	120	2	30	18.9626
24	1	130	2	30	29.734
25	1	110	3	30	13.973
26	1	120	3	30	18.970
27	1	130	3	30	23.9468
28	2	110	1	0	0
29	2	120	1	0	0
30	2	130	1	0	0
31	2	110	2	0	0
32	2	120	2	0	0
33	2	130	2	0	0

34	2	110	3	0	0
35	2	120	3	0	0
36	2	130	3	0	0
37	2	110	1	15	2.6008
38	2	120	1	15	10.3398
39	2	130	1	15	8.5000
40	2	110	2	15	6.24295
41	2	120	2	15	16.3189
42	2	130	2	15	21.5245
43	2	110	3	15	13.1690
44	2	120	3	15	20.1332
45	2	130	3	15	27.8146
46	2	110	1	30	5.8358
47	2	120	1	30	10.7212
48	2	130	1	30	16.9623
49	2	110	2	30	17.8645
50	2	120	2	30	17.4079
51	2	130	2	30	30.1840
52	2	110	3	30	14.6313
53	2	120	3	30	17.7545
54	2	130	3	30	16.46358

En la tabla 18, marcamos con color amarillo las condiciones de los experimentos en la cual obtenemos una mayor cantidad de azúcares igual que sus resultados y con verde las condiciones y resultados en los que obtenemos la menor cantidad de azúcares.

3.6 RESULTADOS Y GRÁFICOS DE LA HIDRÓLISIS ÁCIDA

Se presenta en la tabla 19 un promedio de los resultados de la obtención de azúcares fermentables mediante la hidrólisis ácida, con estos resultados podemos decir que las condiciones en las que obtenemos una mayor concentración de azúcares es a una temperatura de 130 °C, con una concentración de ácido del 2% y un tiempo de reacción de 30 minutos, marcado con un color amarillo ,en la figura 39 se grafican los puntos

óptimos de dicha experimentación, al igual que su respectivo análisis de varianza mostrado en la tabla 20.

Tabla 19: Producción de azúcares totales en la hidrólisis ácida

Tiempo de Reacción (min)	110 °C			120°C			130°C		
	Ácido 1%	Ácido 2%	Ácido 3%	Ácido 1%	Ácido 2%	Ácido 3%	Ácido 1%	Ácido 2%	Ácido 3%
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	2.62	5.882	13.19	9.503	15.395	19.18	9.086	20.69	26.77
30	5.43	17.24	14.31	10.40	18.184	18.36	16.17	29.95	20.20

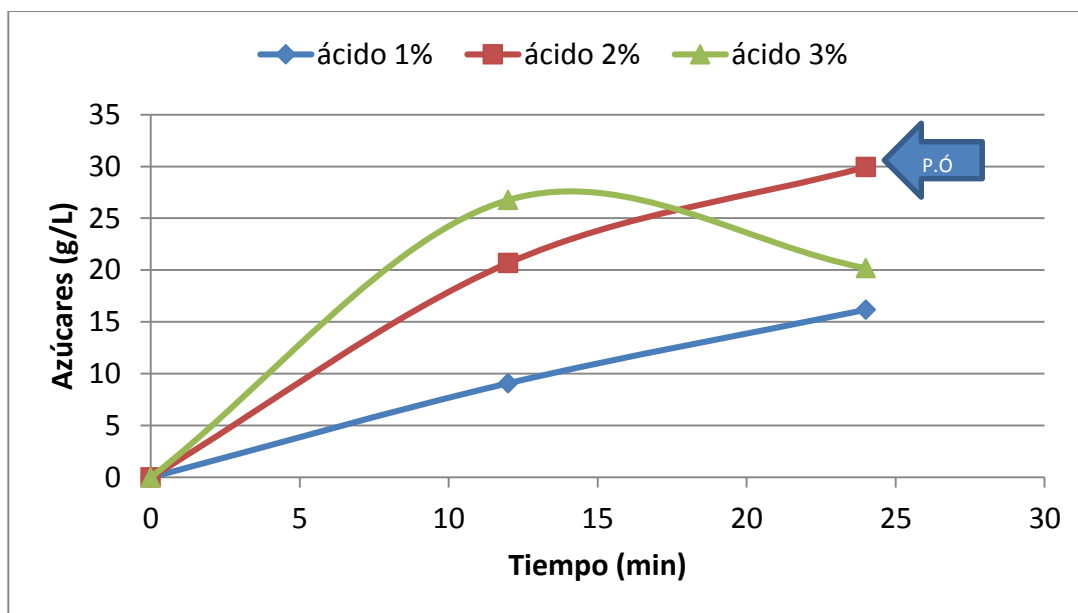
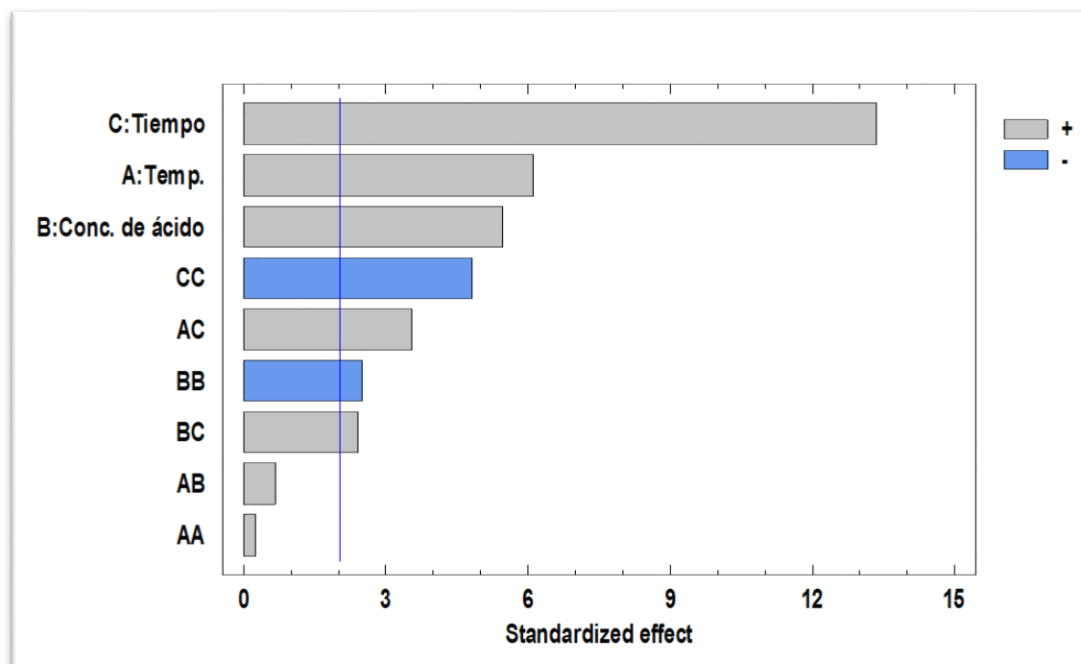


Figura 39: Azúcares obtenidos en la hidrólisis ácida a 130 °C

Tabla 20: Análisis de varianza en la obtención de azúcares, hidrólisis ácida

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
A:Temp.	555.361	1	555.361	37.45	0.0000
B:Conc. de ácido	445.029	1	445.029	30.01	0.0000
C:Tiempo	2644.77	1	2644.77	178.37	0.0000
AA	0.933681	1	0.933681	0.06	0.8031
AB	6.59412	1	6.59412	0.44	0.5084
AC	185.358	1	185.358	12.50	0.0010
BB	92.4599	1	92.4599	6.24	0.0164
BC	87.0131	1	87.013	5.87	0.0197
CC	344.299	1	344.299	23.22	0.0000

**Figura 40:** Diagrama de Pareto para la obtención de azúcares, hidrólisis ácida

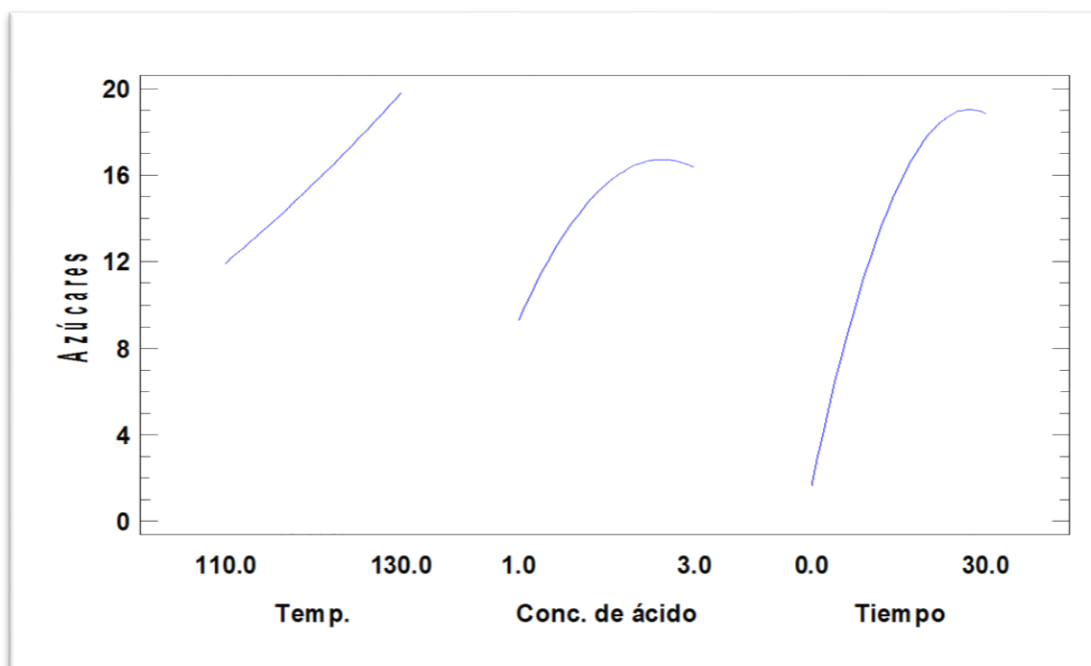


Figura 41: Interacción de las variables en la obtención de azúcares, hidrólisis ácida

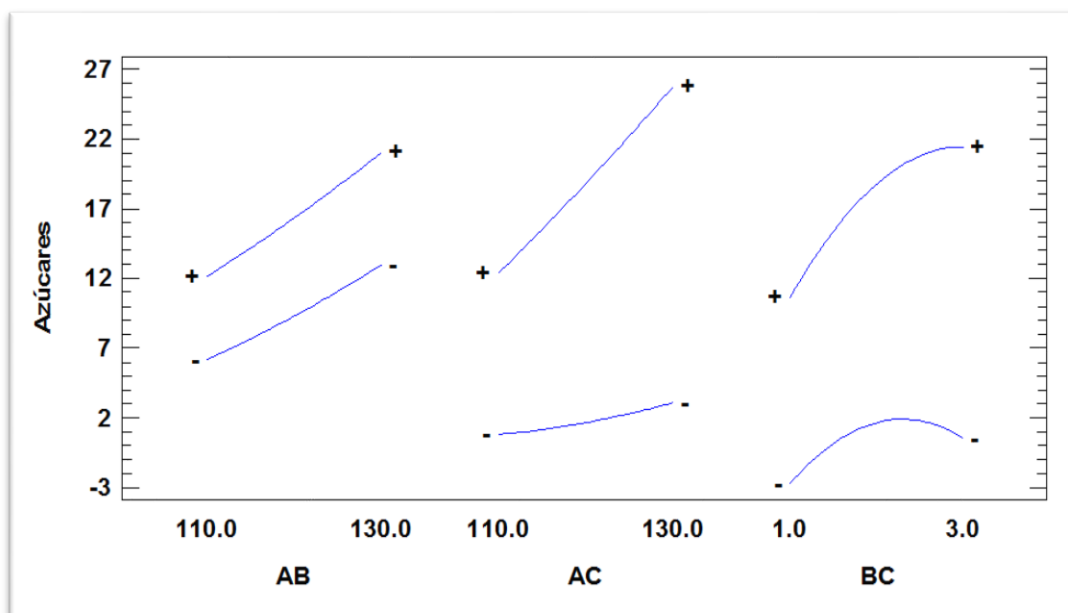


Figura 42: Interacción de las variables para la obtención de azúcares, hidrólisis ácida

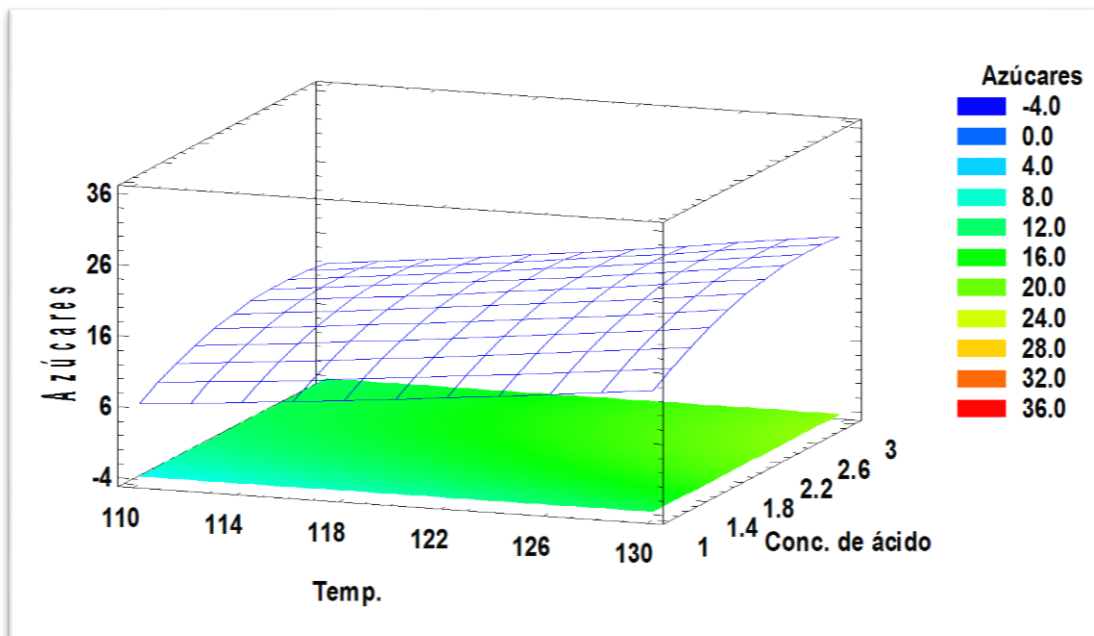


Figura 43: Superficie de respuesta de la obtención de azúcares en la Hidrólisis ácida.

La ecuación que representa a la superficie de respuesta graficado en la figura 43 es la siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Azúcares} = & 26.3016 - 0.659426 * \text{Temp.} + 6.42496 * \text{Conc.de ácido} - 1.19153 \\ & * \text{Tiempo} + 0.00278939 * \text{Temp.}^2 + 0.0524171 * \text{Temp.} * \text{Conc.de ácido} + \\ & 0.0185272 * \text{Temp.} * \text{Tiempo} - 2.77579 * \text{Conc.de ácido}^2 + 0.126939 * \\ & \text{Conc.de ácido} * \text{Tiempo} - 0.0238065 * \text{Tiempo}^2 \end{aligned}$$

3.7 AZÚCARES OBTENIDOS DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA, RESULTADOS Y GRÁFICAS

Como segundo paso, los sólidos remanentes de la hidrólisis química se llevaron a una digestión enzimática, las enzimas utilizadas son enzimas comerciales (Celluclast 1.5 L y Novozyme 188), como se describe en la metodología, los productos obtenidos fueron principalmente glucosa con una pequeña cantidad de Xilosa, se hizo la sumatoria de estos productos para obtener los azúcares totales fermentables en la hidrólisis enzimática.

Para la hidrólisis enzimática se utilizó el residuo procedente de los experimentos de la hidrólisis química que reportaron una menor cantidad de azúcares al igual que el máximo, marcados de color verde los de menor cantidad de azúcares y amarillo los de mayor cantidad, los cuales podemos ver en la tabla 18, estos se reportaron en esta parte del trabajo como experimento 1 y experimento 2, los resultados de la hidrólisis enzimática se reportaron en la tabla 21, graficándose en la figura 44.

Tabla 21: Resultados de la Hidrólisis enzimática

Tiempo de reacción (hrs)	Experimento 1 Glucosa (g/L)	Experimento 2 Glucosa (g/L)
0	0	0
24	7,86	8,78
48	15,95	17,52
72	23,72	19,57
96	28,86	23,46
120	32,82	26,98
∞	33,21	27,23

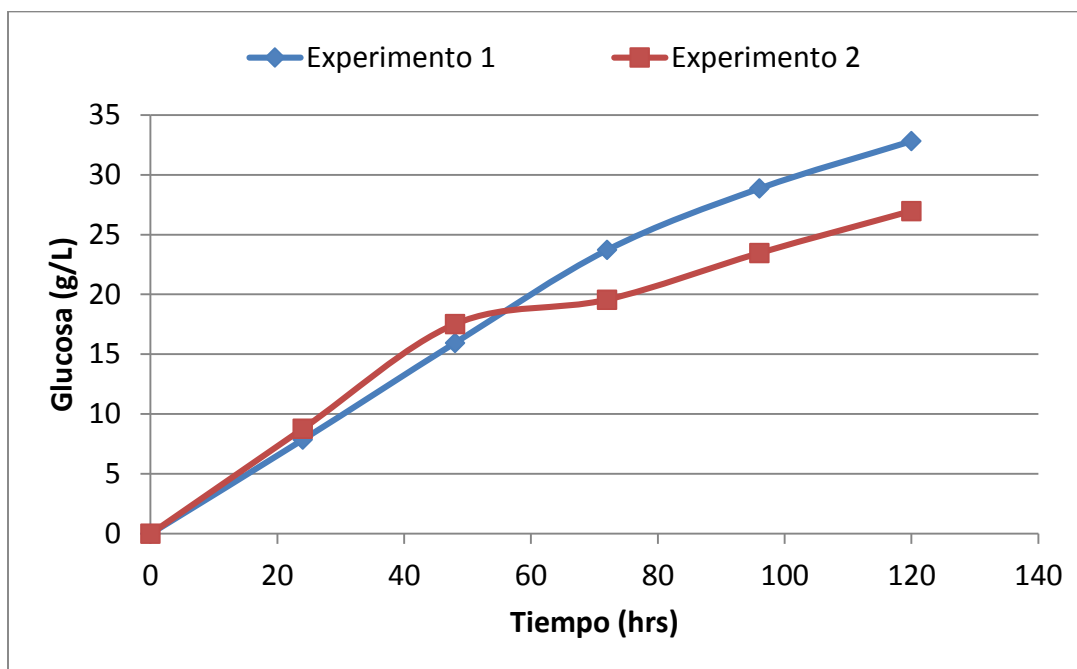


Figura 44: Resultados de la hidrólisis enzimática, comparación experimento 1 y experimento 2

Los resultados indican una mayor cantidad de azúcares en el experimento 1, este corresponde a una menor cantidad de azúcares en la hidrólisis química.

3.8 AZÚCARES TOTALES OBTENIDOS

Después de llevar a cabo los procesos de sacarificación y analizar cada uno de los resultados obtenidos a las diferentes condiciones de reacción se realizó la sumatoria de los azúcares obtenidos en la hidrólisis ácida como en la enzimática y a estos se le denominaron azúcares totales, los resultados se muestran en las tablas 22, mientras que en la figura 45 se encuentran graficados estos resultados.

Tabla 22: Azúcares totales, azúcares obtenidos de la hidrólisis enzimática sumados con los azúcares de la hidrólisis ácida

tiempo de reacción	Experimento 1 Azúcares (g/L)	Experimento 2 Azúcares (g/L)
0	0	0
15	35.83	47.23
30	38.64	57.18

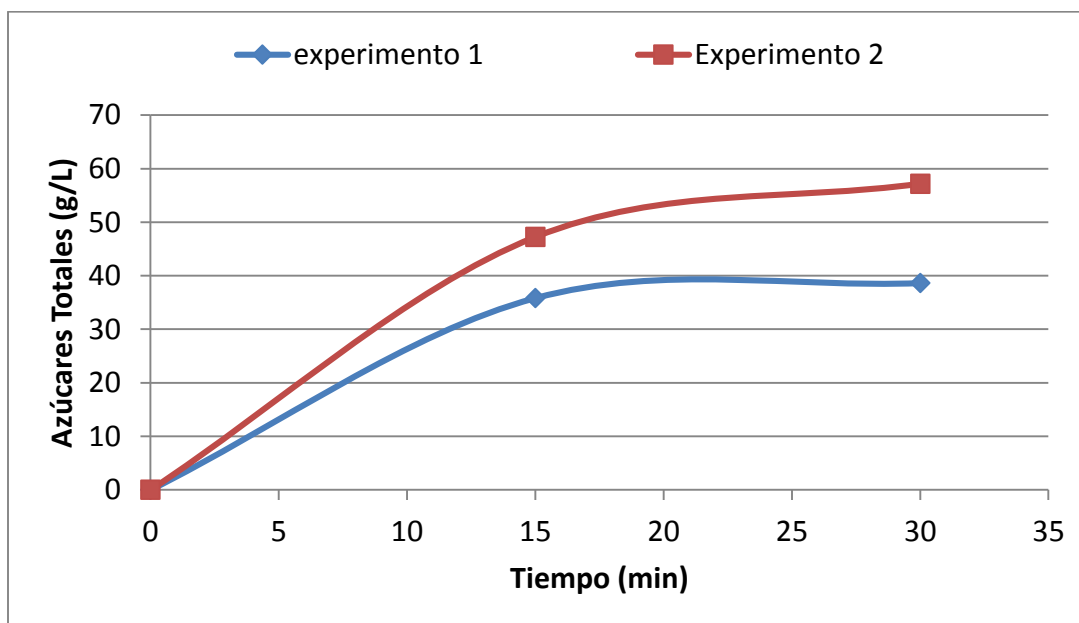


Figura 45: Azúcares totales, azúcares obtenidos de la hidrólisis enzimática sumado con los azúcares de la hidrólisis ácida

Podemos concluir que al sumar las cantidades de azúcares que se obtienen en ambos pasos de sacarificación la mayor cantidad de azúcares fermentables es obtenida al extraer la mayor cantidad en la hidrólisis ácida y el residuo llevarlo a hidrólisis enzimática.

3.9 COMPARACIÓN, OBTENCIÓN DE AZÚCARES CON MATERIA PRIMA SIN NINGÚN TRATAMIENTO

El residuo obtenido después de la extracción de aceites esenciales, fenoles y flavonoides, se llevó a un proceso de sacarificación, en esta parte del trabajo a esta extracción le llamaremos sacarificación 1, llamando sacarificación 2 a una segunda sacarificación realizada con materia prima nueva.

El motivo fue hacer una comparación en el rendimiento de estas extracciones, reportando en la tabla 23 la sumatoria de los azúcares obtenidos en los pasos de hidrólisis química e hidrólisis enzimática de ambos casos.

Tabla 23: Comparación de resultados, azúcares totales

Tiempo de Reacción (min)	Sacarificación 1	Sacarificación 2
0	0	0
72	47.23	51,94
120	57.18	60,6

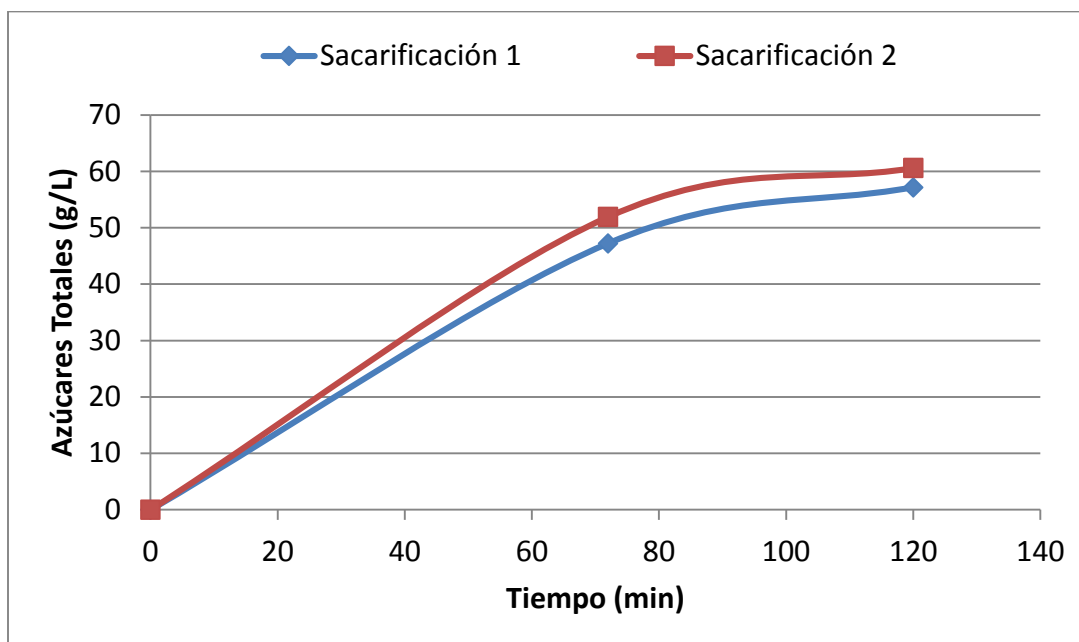


Figura 46: Comparación de resultados, azúcares totales, Sacarificación 1 y Sacarificación 2

Podemos observar en la figura 46 que obtenemos cantidades muy semejantes de azúcares y de inmediato llegamos a la conclusión que estamos perdiendo compuestos importantes de la materia prima que se pueden aprovechar si no se separan antes.

3.10 DETERMINACIÓN DE LIGNINA

Se cuantificó la lignina, denominada lignina Klason descrita en la metodología.

Tabla 24: Lignina Klason

	Porcentaje en peso de materia seca
Lignina	3.69

4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La producción de limón en México es aproximadamente 2 055 209 ton, por lo tanto se producen grandes cantidades de cítricos que no es aprovechado los cuales se consideran contaminantes debido a las grandes cantidades de estos desechos, la utilización de estos como matería prima implica que los costos de este insumo serán mínimos y la recuperación de componentes de este material son redituables.

En este caso se obtuvo 2.38 g de aceite esencial que se extrajo por medio del equipo Soxhlet, se obtuvieron también fenoles y flavonoides, la cuantificación de estos compuestos se realizó mediante la técnica de espectrofotometría. El mejor modelo de extracción de los compuestos fenólicos al igual que el de los flavonoides fue con una concentración de disolvente (Etanol) al 80%, con un tiempo de 12 horas y una temperatura de 45 °C para los fenoles y 75°C para los flavonoides, obteniéndose 3.5538 mg/g b.s. y 3.3804 mg/g b.s. respectivamente.

La sacarificación se realizó, primero con una hidrólisis ácida y segundo con el residuo del primer paso se sometió a una digestión enzimática y se obtuvieron los resultados siguientes, 29.95 g/L en la hidrólisis ácida y 27.23 g/L en la digestión enzimática y haciendo un comparativo se obtuvo un rendimiento de 79.41% y 84.16% en los azúcares totales obtenidos en las dos sacarificaciones, siendo la primera aquella que se realizó después de haber separado los aceites esenciales, fenoles y flavonoides y la segunda aquella sacarificación que se realizó con materia prima nueva

El análisis realizado en el presente trabajo nos permite asegurar que podemos tener grandes cantidades de limón que será desechado en el estado de Michoacán y posiblemente en otros estados productores y que podemos rescatar y procesar para la obtención de compuestos como los descritos anteriormente.

Sin embargo, antes de proponer un proceso integral, se recomienda analizar los componentes que puedan aprovecharse del jugo, así como, realizar la fermentación de los licores azucarados que se obtuvieron en este trabajo.

De igual manera, es necesario hacer un análisis económico de los procesos involucrados que permitirá determinar la factibilidad de este aprovechamiento.

5 BIBLIOGRAFÍA

1. Adler E. (1977). Lignin chemistry: past, present and future. *Wood Sci. Technol.* 11:169-218.
2. Álvarez Maciel C., *Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional.*, tesis doctoral, Posgrado de Ingeniería, UNAM. 2010.
3. A.Miller, Shelie. *Minimizing Land Use and Nitrogen Intensity of Bioenergy.* *Environ. Sci. Technol.*, 2010, 44(10), pp 3932-3939. April 26, 2010.
4. Ariza, L., Caparros, S., Jimenez, L. (2005). Subproductos en la fabricación de pastas. Autohidrolisis de Hemicelulosas. Ed. Graficas Sol. ISBN:84-96302-10-5.
5. Aro N., Pakula T. & Penttila M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell Wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol.*
6. Asami, D.K., Hong, Y.J., Barrett, D.M., Mitchell, A.E. 2003, Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry and corn grown using conventional, organic and sustainable agricultural practices, *Journal of Agricultural Food Chemistry*.
7. Ballasteros I., Oliva J. M., Saez F., & Ballasteros M. (2001). Ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation of olive oil extraction. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91/93:237-252.
8. Bhimanagouda S. Patil, Jayaprakasha, G. K., Chidambara, M.K.N., and Amit V. 2009. Bioactive Compounds: Historical Perspectives, Opportunities and Challenges. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57:8142–8160.
9. Bocco, A., Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C. 1998. Antioxidant Activity an Phenolic Composition of Citrus Peel and Seed Extracts. *Journal of Agricultural Food Chemistry*.

10. Bushra, S.; Farooq, A.; Muhammad, A. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules* 2009, *14*, 2167–2180.
11. Carrol, K.K., Kurowska, E.M., Guthrie, N., 1999, Use of citrus limonoids and flavonoids as well as tocotrienols for the treatment of cancer, en *International Patent. WO*.
12. Cerón Salazar I, Cardona Álzate C., Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de cáscara de naranja, Ingeniería y Ciencia, ISSN 1794-9165, Volumen 7, número 13, enero-junio de 2011, páginas 65-86.
13. Chiang, V.L. (2006). Monolignol biosynthesis and genetic engineering of lignin in trees, a review. *Environmental chemistry letters*, 4(3), 143-146.
14. Davin, B.L. & Lewis, G.N. (2005). Lignin primary structures as dirigents sites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(4), 407-415.
15. Del Río, J.A., Fuster, M.D., Gómez, P., Porras, I., García-Lidón, A., Ortuño, A., 2004, *Citrus Limon: A source of flavonoids of pharmaceutical interest*, *Food Chemistry*.
16. Di Majo, D., Giammanco, M., La Guardia, M., Tripoli, E., Giammanco, S., Finotti, E., 2005. Flavanones in *Citrus Fruit*: Structure-antioxidant activity relationships. *Food Research International* 38; 1161-1166.
17. Djeridane, A.; Yousfi, M.; Nadjemi, B.; Boutassouma, D.; Stocker, P.; Vidal, N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 2006, 97, 654–660.
18. D Manns, *Phytochemistry* 39: 5 (JUL 1995) 1115-1118.
19. E. Contreras V., L. Masson S., R Fuentes T. y M. Abarca A. Composición del aceite esencial del limon por cromatografía gas líquido. Sept 1980.
20. Eisentraut. A., Sustainable production of second-generation biofuels. *Potential and perspectives in major economies and developing countries*. International Energy Agency. February 2010.

21. Energía y sostenibilidad. La energía y el medio Ambiente en la Union Europea. Madrid, Endesa, directorio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. 18 p. noviembre del 2006.
22. Eskin, N.A., Snait Tamir, 2006, *Dictionary of Nutraceutical Foods*, Taylor and Francis Group.
23. Fernandez J. (1995). La biomasa como Fuente de energia y productos no alimentarios., La biomasa como Fuente de energia y productos para la aguricultura y la industria. Serie ponencias. Editorial CIEMAT. Madrid.
24. Ferry, D.R.; Smith, A.; Malkhandi, J. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for *in vivo* tyrosine kinase inhibition. *Clin. Cancer Res.* 1996, 2, 659–668.
25. Fosir., Tendencias internacionales y nacionales del mercado de limón, dirección de inteligencia competitiva sectorial, 2004.
26. Galbe M. & Zacchi G. (2002). A review of the production of etanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59.
27. Gellerstedt, G. & Henriksson, G. (2008). Lignins: Major sources, structure and properties. En M. Naceur Belgacem, & A. Gandini (Edits.), *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources* (págs. 201-224). Amsterdam: Elsevier B.V.
28. Gracia Nava M. A., “Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales”, Universidad Autónoma de Querétaro, 2008.
29. González V. A. A.; obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas de las amazonas, universidad nacional de Colombia, departamento de ingeniería química abril de 2004.
30. Guignard, J-L., Cosson, L., Henry, M.; "ABREGE DE PHYTOCHIMIE", Masson, Paris-New York-Barcelone, 1985, Capítulo 8.
31. [Http: //acva.galeon.com](http://acva.galeon.com), Asociación de Citricultores del Valle de Apatzingán A.C., Productores de Limón del Estado de Michoacán.

32. Hernández M. (1997). Decoloración de efluentes alcalinos de industrias papeleras por *Strptomycesspp*,: aspectos químicos y enzimáticos. Tesis doctoral, universidad de Alcalá de Henares.
33. Higuchi T. (1990). Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. Wood Sci. Technol.
34. Hill, J., E., Tilman, D., Polasky, S., Tiffany, D., (2006). Evironmental, economic, and energetic cost and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. PNAS 103 (30).
35. <http://observatoriodeprecios.com.mx/index.php/preciosproductos/productos agropecuarios/limon/156-citricos-comportamiento-de-limon-en-el-mercado>.
36. <http://www.infoagro.com/citricos/naranja.htm>
37. IAE (Agencia Internacional de Energia). (2004). Biofuels for transport: an international perspective. 9 rue de le federation, 75739Paris Cedex 15, France. Disponible desde www.iea.org.
38. J. Palazón, R.M. Cusidó y C. Morales., *Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino*, Grupo de Biotecnología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, (2009).
39. Kang, H.J., Chawla, S.P., Jo, C., Kwon, J.H., Byun, M.W. 2006, Studies on the development of functional powder from citrus peel, *Bioresource Technology* 97: 614-620.
40. Kawaii, S., Yomono, Y., Katase, E., Ogawa K., Yano, M., Meisaku, K., Chihiro, I., Hiroshi F., 2000, Quantitative Study of Flavonoids in Leaves of Citrus Plants. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 40: 3865-3871.
41. Kim, D.; Jeond, S.; Lee, Ch. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem*. 2003, 81, 321–326.
42. Larsson S. (2000). Ethanol from lignocellulose-fermentation inhibitors, detoxification and genetic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced resistance. Tesis doctoral. Lund. Suecia.
43. Liu, C.-j., Miao, Y.-C. & Zhang, K.-W. (2011). Sequestration and transport of lignin monomeric precursors. *Molecules*, 16, 710-727.

44. Liu, H.; Qiu, N.; Ding, H.; Yao, R. Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medicinal or food uses. *Food Res. Inter.* 2008, *41*, 363-370.
45. Luximon-Ramma, A.; Bahorun, T.; Soobrattee, A.M.; Aruoma, O. I. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin and flavonoid components in extracts of *Acacia fistula*. *J. Agr. Food Chem.* 2005, *50*, 5042–5047.
46. Maeda-Yamamoto, M., Kawahara, H., Tahara, N., Tsuji, K., Hara, Y., Isemura, M., 1999, Effect of tea polyphenols on the invasión and matrix metalloproteinases activities of human fibrosarcoma HT1080 cells. *Journal of Agricultural Food Chemistry*
47. Martínez M. A., aceites esenciales, universidad de Antioquia, facultad química farmacéutica Medellín, febrero 2003.
48. Martínez M. A., FLAVONOIDES, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Septiembre 2005.
49. Martínez, V.I., Jesús, P.M., Ros, G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Archivos latinoamericanos de Nutrición.
50. McCall, M.R.; Frei, B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?. *Free Radical Biol. Med.* 1999, *26*, 1034–1053. Chen, H.G.; Yu, Y.G.; Zeng, O. X. Study on extraction of flavonoids and Alkaloids from lotus leaf. *Food Sci.* 2002.
51. Montenecurt B., & Eveleigh D.E. (1979). Production and characterization of high yielding cellulose mutants of *Trichoderma reesei*. TAPPI Annual Meeting Proceeding, technical Association of the pulp and Paper Industry, Atlanta.
52. Merken, H.M., Beecher, G.R., 2000. Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Journal of Agricultural Food Chemistry*.
53. Norbert Hackenberg. Biocombustibles de segunda generación. Revista virtual Redesma, julio del 2008. Centro boliviano de Estados Unidos Multidisciplinario.

54. Osawa, M.T.; Huang, S.; Rosen, R.T. *Chemistry and Antioxidative Effects of Phenolic Compounds from Licorice, Tea and Compositae and Labiateae Herbs*. American Chemical Society: Washington, DC, USA, 1994.
55. Oshe, J.J., Seule, M.J., Dijkman, M.J., Wehlburg, C. 1972. Cítricos. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Vol.1.
56. Rajagopal, D. and D. Zilberman. *Review of Environmental, Economic and Policy Aspects of Biofuels*. World Bank Policy Research Working Paper No. 4341.
57. Rincón M.A., Vásquez, A. M., Padilla, F.C. 2005. Composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cascara de naranja (*C. sinensis*), mandarina (*C. reticulata*) y toronja (*C. paradisi*) cultivadas en Venezuela. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. Vol.55.
58. Rothkopf, Garten; A Blueprint for Green Energy in the Americas; Inter-American Development Bank, USA: 2007: <http://www.iadb.org/biofuels>.
59. Salinas Callejas, Edmar; Gasca Quezada, Victor. Los biocombustibles, El cotidiano, núm. 157, septiembre-octubre, 2009, pp. 75-82. Universidad Autónoma Metropolitana del Distrito Federal, México.
60. Saucedo Luna J. Tesis. "Estudio de la Hidrólisis del lirio Acuático con Ácido Sulfúrico". División de estudios de posgrado Facultad de Ingeniería Química, UMSNH, (2004).
61. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (Sagarpa); Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (México): <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>
62. Seok-Moon, J., So-Young, K., Dong-Ryul, K., Seong-Chun, J., Nam, K.C., Ahn, D.U., Seung-Cheol, L. 2004. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agricultural Food Chemistry*.
63. Steven E. S. and Zilberman D. Biofuel Impacts on Climate Change, the Environment and Food. Report to the Renewable Fuels Agency. May 2008.

64. St-Onge, M.P., 2005. Dietary fats, teas, dairy and nuts: potential functional foods for weight control. *Am.J.Clinical.Nutrition*.
65. Sustainable production of second-generation biofuels. Potential and perspectives in major economies and developing Countries . Anselms Eisentraut. International Energy Agency. February 2010.
66. Ting, S.V., Attaway, J.A., 1971, The Biochemistry of citrus fruits and their products. *Citrus Fruits, cap.3*: 107-161.
67. Ting, S.V., Russell L. Rouseff. 1986, *Citrus fruits and their products*, New York Basel, Marcel Dekker Inc.
68. Weier, E. M., Stocking, G., Michael C.B., 1979, *Botánica* 5ª ed. p. 322-323.
69. Wyman C.E. (1999) production of low cost sugars from biomass: pregress, opportunities and challenges. Overend, R.P. and Chornet, E. 1, 867-872. Pergamon, Oxford, Proceeding of the 4ª Biomass Conference of the Americas. Biomass-a growth opportunity in green energy and value-added products.
70. Wyman CE (ed) Handbook on bioethanol: production and utilization. Taylor and Francis, Bristol. 351 - 357.