



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL

Efecto del pretratamiento sobre las características microestructurales
y el rendimiento de obtención de azúcares reductores totales de
la cascarilla de arroz (*oryza sativa l.*) Durante el proceso de
hidrólisis con celulasa (e.c:3.2.1.4.)

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

Ingeniero Agroindustrial

AUTOR:

Br. Aredo Ortiz, Fernando Antonio (ORCID: 0000-0003-2810-7988)

ASESORA:

Mg. Pagador Flores, Sandra Elizabeth (ORCID: 0000-0001-6371-7138)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Biotecnología Industrial

TRUJILLO - PERÚ

2020

Dedicatoria

Primeramente, agradezco a Dios por la culminación de esta etapa universitaria, porque él es mi fiel compañero, mi sostén y mi fuerza que nos lleva de la mano por la vida y nos mantiene en pie, si bien no nos demos cuenta.

Dedico de manera especial a mis padres, a don Alejandro Santos Aredo y a doña Eucebia Ortiz Zarate por sus consejos, el amor brindado y su apoyo constante, enseñándome que el dinero no es lo más trascendente en nuestra vida, sino, lo que nos define como humanos es la humildad, el respeto, la responsabilidad y el amor.

A mis hermanos Jorge Luis y Víctor miguel Aredo Ortiz, que son mi razón y motivo de superación en ser cada día mejor.

FERNANDO ANTONIO AREDO ORTIZ

Agradecimiento

Primeramente, agradezco a Dios por permitirme culminar este proyecto, además de darme fuerzas cuando más lo necesite, por acompañarme y guiarme por esta vida universitaria y por retribuirme de bendiciones.

A mis padres por acompañarme en todos estos años que están a mi lado y dieron todo su esfuerzo hasta el último momento para yo culminar mis estudios universitarios.

A mis Tíos Fernando Cruz y Celia Zarate por acogerme como un hijo y apoyarme día a día.

A Yosmelinda Riveros Riveros, por el apoyo incondicional que fue fundamental para la culminación de mi proyecto, además de pertenecer a mi lado en los momentos más difíciles de mi vida universitaria y brindándome aliento en cada tropiezo.

Al Dr. Guillermo Alberto Linares Luján por su amistad, paciencia y tiempo en el desarrollo y la culminación de mi investigación.

A mis compañeros Anderson, Iris y Jhonn, por todos los momentos compartidos en esta vida universitaria, paciencia y confianza.

A la Universidad César Vallejo por brindarme la oportunidad de ser parte de su gran casa de estudios, así como también agradecer a la Universidad Nacional de Trujillo y a la Universidad Privada Antenor Orrego por acceder a realizar mis análisis de suma importancia para la culminación con esta investigación.

FERNANDO ANTONIO AREDO ORTIZ

Índice de contenidos

Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Índice de contenidos.....	iv
Índice De Tablas.....	vi
Índice De Gráficos y Figuras.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	6
III. METODOLOGÍA.....	14
3.1. Tipo y diseño de investigación.....	14
3.2. Operacionalización de variables.....	15
3.3. Población y muestra.....	18
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.....	18
3.5. Procedimiento.....	20
3.6. Métodos de análisis de datos.....	22
3.7. Aspectos éticos.....	23
IV. RESULTADOS.....	24
V. DISCUSIÓN.....	32
VI. CONCLUSIONES.....	38
VII. RECOMENDACIONES.....	39
REFERENCIAS.....	40
ANEXOS.....	47

Índice De Tablas

Tabla 1. Operacionalización de las variables de investigación.....	16
Tabla 2. Composición química de la cascarilla de arroz homogénea.....	24
Tabla 3. Estructura lignocelulósica de la cascarilla de arroz después de los pretratamientos y la comparación con otras investigaciones.....	26
Tabla 4. Concentración de glucosa originada por la hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz.....	29
Tabla 5. Determinación de la humedad de la cascarilla de arroz homogénea (C_0).	54
Tabla 6. Determinación de humedad de la cascarilla pretratadas (C_1 , C_2 y C_3).	54
Tabla 7. Determinación de ceniza de la cascarilla de arroz homogénea (C_0).	54
Tabla 8. Determinación de pH de la cascarilla de arroz homogénea (C_0).	55
Tabla 9. Determinación de la holocelulosa de la cascarilla de arroz.	55
Tabla 10. Determinación de la celulosa de la cascarilla de arroz.	56
Tabla 11. Determinación de la hemicelulosa de la cascarilla de arroz.....	56
Tabla 12. Determinación de la lignina de la cascarilla de arroz.....	57
Tabla 13. Determinación del ancho de la cascarilla de arroz con los diferentes pretratamientos a partir de las micrografías.....	57
Tabla 14. Determinación de glucosa (g/L) cada 12 horas de hidrolizado.	58
Tabla 15. Determinación de la conversión de celulosa a glucosa.....	60
Tabla 16. Análisis de varianza de los componentes lignocelulósicos de la cascarilla de arroz.	66
Tabla 17. Análisis de variancia del ancho de la cascarilla de arroz con los diferentes pretratamientos.	66
Tabla 18. Prueba de Tukey para la anchura de la cascarilla de arroz.....	67
Tabla 19. Prueba de homogeneidad de varianza de la concentración de glucosa.	67
Tabla 20. Análisis de variancia de la concentración de glucosa.	67
Tabla 21. Prueba de Tukey para la concentración de glucosa.....	68
Tabla 22. Prueba de homogeneidad de varianza del rendimiento de Azúcares Reductores Totales	69
Tabla 23. Análisis de variancia del rendimiento de Azúcares Reductores Totales.....	69
Tabla 24. Prueba de Tukey para el rendimiento de Azúcares Reductores Totales.	69

Índice De Gráficos y Figuras

Figura 1 Diseño de los diferentes pretratamientos en la obtención de ART en la cascarilla de arroz.	14
Figura 2 Flujograma de la obtención de ART de la cascarilla de arroz.	20
Figura 3 Componentes lignocelulósicos de la cascarilla de arroz después de diferentes pretratamientos.	25
Figura 4 Micrografías de la cascarilla de arroz homogénea sin pretratamiento y después del pretratamiento.	27
Figura 5. Concentración de glucosa obtenida por la hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz con diferentes pretratamientos.	28
Figura 6 PH del hidrolizado final para los distintos pretratamientos.	30
Figura 7 Transformación de celulosa a glucosa después del hidrolisis enzimático.	30
Figura 8 Cascarilla de arroz seca.....	61
Figura 9. Selección de la cascarilla de arroz seca.	61
Figura 10 Tamizado de la cascarilla de arroz.....	61
Figura 11 Molienda de la cascarilla de arroz.	61
Figura 12 Determinación de cenizas de las muestras.....	61
Figura 13 Determinación de humedad de las muestras.....	61
Figura 14 Tratamiento Químico de alcalinidad.....	62
Figura 15 Tratamiento Físico de Congelación.	62
Figura 16. Determinación de holocelulosa de la cascarilla pretratada y sin pretratar.	62
Figura 17 Determinación de celulosa de la cascarilla pretratada y sin pretratar.	62
Figura 18 Determinación de lignina de la cascarilla pretratada y sin pretratar.	63
Figura 19 Determinación de pH de las muestras.....	63
Figura 20 Preparación del DNS.	63
Figura 21 Muestras para la curva de calibración de glucosa.....	63
Figura 22 Hidrolisis enzimática.	64
Figura 23. Muestras del hidrolisis enzimático cada 12 horas.....	64
Figura 24 Centrifugación de las muestras.	64
Figura 25. Determinación de glucosa por espectrofotometría.....	65
Figura 26 Enzima Celulasa de <i>Aspergillus niger</i>	65

RESUMEN

Se evaluó el efecto del pretratamiento de congelación, alcalinidad y de ambos sobre las características micro estructurales y el rendimiento de obtención de azúcares reductores totales de la cascarilla de arroz (*Oryza sativa L.*) Durante el proceso de hidrólisis con celulasa (E.C:3.2.1.4.). A la cascarilla de arroz homogénea sin y con pretratamientos se hidrolizó con 150 U de Celulasa por cada gramo de residuo en 10 ml de acetato por 60 h, a 37 °C, pH 5.5 y a 100 rpm. Los resultados después de los pretratamientos se obtuvieron que, el C₃ contuvo un mayor % celulosa (62.51 ± 0.3), menor % hemicelulosa (12.44 ± 0.28) y aumento % lignina ($24.72 \pm 0.14\%$). Además, en el análisis de microscopía electrónica se observa mayor división, y menor aglomeramiento observándose una estructura en forma de red cristalina. Así mismo tuvo un mayor rendimiento en la obtención de azúcares reductores ($673,84 \text{ mg}_{\text{ART}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$) y un mejor porcentaje de conversión de celulosa con un 97.01% a comparación de los pretratamientos. Concluyendo estadísticamente, que, si hay diferencia significativa entre la relación del rendimiento de obtención de azúcares reductores totales, características microestructurales sobre los pretratamientos.

Palabras Clave: cascarilla de arroz, Congelación, Pretratamiento alcalino, Celulasa, Hidrólisis enzimática.

ABSTRACT

The effect of pre-treatment of freezing, alkalinity and both on the microstructural characteristics and yield of total reducing sugars of rice husks (*Oryza sativa* L.) was evaluated during the hydrolysis process with cellulase (EC: 3.2.1.4.). The homogenous rice husk without and with pretreatments was hydrolyzed with 150 U of Cellulase for each gram of residue in 10 ml of acetate for 60 h, at 37 ° C, pH 5.5 and at 100 rpm. The result after the pretreatments was obtained that, the C3 contained a higher% cellulose (62.51 ± 0.3), lower% hemicellulose (12.44 ± 0.28) and increase% lignin ($24.72 \pm 0.14\%$). Also, in the analysis of electron microscopy, greater division is observed, and less agglomeration, observing a structure in the form of a crystalline network. Likewise, it had a higher yield in obtaining reducing sugars (673.84 mgART / gsubstrat) and a better percentage of cellulose conversion with 97.01% compared to pretreatments. Concluding statistically, that if there is significant difference between the ratios of the yield of obtaining total reducing sugars, microstructural characteristics on the pretreatments.

Keywords: rice husk, Freezing, Alkaline pretreatment, Cellulase, Enzymatic hydrolysis

I. INTRODUCCIÓN

Estas últimas épocas, nuestro planeta está desafiando una escasez paulatina de recursos energéticos, basados en su totalidad en combustibles fósiles no renovables. Simultáneamente, la demanda mundial de energía se desarrolla cada vez a un ritmo progresivo, originando con ello, la dependencia energética y la economía a las naciones fabricantes de biocarburantes (IEA, 2010 y IPCC, 2011). El Perú, no es ajeno a esta problemática mundial y las estadísticas actuales indican que la fabricación del crudo convencional del Perú se disminuye gradualmente desde el año 1980; habiéndose estimado, que desde el 2002 al 2012, la fabricación nacional se ha reducido en 27 mil barriles diarios (Perupetro, 2012). Es por ende que en el Perú con el transcurso de los años nos encontraremos con una mínima cantidad de recurso energético, arriesgándose hacia una inferioridad energética nunca antes imaginado y desarrollando una vulnerabilidad energética de nuestro país.

Frente a este escenario, la biotecnología, ofrece alternativas tecnológicas que a partir de la producción de biomasa lignocelulósica se pueden obtener energías verdes como el bioetanol, biodiesel y biogás. Para la producción de primera generación del bioetanol se utilizan los almidones y azúcares procedentes de maíz y caña de azúcar correspondientemente, estos son utilizados como una biomasa que relativamente son costosas; por el contrario, en el manejo de biomasa de segunda generación, como son los residuos lignocelulósicos, que son renovables, accesibles, abundantes y no perturban en la alimentación humana (Almarsdottir *et al.*, 2012; Kootstra *et al.*, 2009 y Alvira *et al.*, 2010).

La biomasa lignocelulósica de segunda generación está constituida por lignina, hemicelulosa y celulosa en una pared entramada de microfibrillas formando una agrupación entre la lignina y celuloso, ocasiona una difícil accesibilidad a las enzimas para su transformación a azúcares fermentables (Echeverría *et al.*, 2017). Por este motivo estos residuos lignocelulósicos demandan un pretratamiento (biológico, mecánico, químico, etc.) ya que así la lignina se podrá fragmentar y posteriormente se podrá reponer la celulosa que seguidamente a través de un

proceso de hidrólisis enzimático se obtendrá azúcares fermentables (Echeverría *et al.*, 2017).

Ante esta problemática descrita, se origina la búsqueda de nuevas opciones para la producción de energías verdes, las que convienen estar encaminadas a los residuos lignocelulósicos, principalmente los que son de gran cantidad en nuestra región y que se encuentren como una biomasa de residuos (Barrena, 2009 y Avella, 2009). En el Perú teniendo en cuenta la gran cantidad de biomasa agroindustrial producida; la cascarilla de arroz en el 2017 ha generado cerca de 3 millones 44,9 mil Toneladas métricas, lo que le coloca en el segundo cereal más consumido de nuestro país después del maíz según el Ministerio de Agricultura y Riego, (2017). Este residuo lignocelulósico representa una gran cantidad, que a su vez tiene un pequeño aporte para el beneficio del planeta, porque la mayor parte es quemada o tirada, generando así un deterioro al medio ambiente.

Por esta razón la utilización de la cáscara de arroz es importante porque posee un elevado potencial en la fabricación de biocombustibles; especialmente por su composición química que hace ser un buen recurso para la producción de energías verdes. Que dentro de los rangos obtenidos de la cascarilla de arroz a nivel internacional la lignina posee entre los (18,20% - 24,60%), la hemicelulosa (18,10% - 27,06%) y celulosa (25,89% - 39,05%) (Huaraz C. 2013). Esto hace que la convierta en una biomasa principal para la obtención de bioetanol, sin embargo para obtener este producto es inevitable ejecutar un pretratamiento por el motivo que posee un contenido de lignina y hemicelulosa que puede producir inhibidores o alguna barrera en la fabricación de bioetanol además de contar con un alto contenido de celulosa, ya que esto genera una maximización en la hidrólisis enzimática y por consiguiente se consigue un aumento en el rendimiento directo de los azúcares reductores para finalmente obtener etanol de segunda generación.

De acuerdo a las investigaciones que se realizaron se tiene lo siguiente:

Ji *et al.*, (2016) Investigaron distintos métodos de fraccionamiento mecánico para obtener muestras de mazorca de maíz, en otros términos, a nivel planta (>1 mm), de (500 a 100 micras) nivel tejido y también de (50 a 30 micras) nivel celular; en el

cual analizaron sus características microestructurales como también la hidrólisis enzimática. Dentro de sus resultados en la hidrólisis enzimática y características microestructurales a un nivel planta y de tejido vegetal, no se percibe un cambio significativo. Por el contrario, en el nivel celular presentaron algunas propiedades específicas como una ampliación en el área superficial, también una fracturación cristalina de la celulosa, además de un elevado contenido de polisacáridos en la parte superior y ligadura de ellos; lo cual optimizó la digestibilidad enzimática en un 98.3% de transformación de celulosa a glucosa.

Chang *et al.*, (2010) realizaron un estudio sobre la conversión enzimática con pretratamiento por congelación de paja de arroz; investigaron que el pretratamiento por congelación aumenta elocuentemente la digestibilidad enzimática del 48% al 84% de la cáscara de arroz. De acuerdo con el efecto, de la paja de arroz hidrolizada con 100 U de xilanas y celulosa 150 U sin pretratamiento produjeron 93.84 gKg⁻¹ y 226.77 gKg⁻¹ de Azúcares fermentables. No obstante, el rendimiento de ART del pretratamiento por congelado con las mismas condiciones fue de 417.27 gKg⁻¹ y 138.77 gKg⁻¹ de sustrato proporcionalmente. Asimismo, la obtención de mayor contenido de glucosa es de 371.9 Kg⁻¹ de paja de arroz seca durante la hidrólisis con pretratamiento. Indicando que la congelación como pretratamiento es eficaz para el proceso de hidrólisis y cuenta con un bajo impacto ambiental.

Echeverría C. *et al.*, (2017). Determinaron el efecto de la congelación, acidificación y de ambos pretratamientos en la mazorca de maíz (*Zea mays* L.) y la hidrólisis enzimática en sus componentes lignocelulósicos y características macroestructurales. La fibra de mazorca se congeló a -20 °C por 12 h con un tampón de acetato de sodio; ácido sulfúrico 0.25 M y también se pretrato por ambos pretratamientos. Resultando que el pretratamiento de ambos obtuvo mayor contenido de celulosa y lignina, además de menor hemicelulosa. Además, en el análisis de microscopía óptica del pretratamiento de ambos y el de la muestra sin pretratamiento, se observó más particionadas, menos aglomerados notando un tejido cristalino. Concluyendo que la mayor concentración de glucosa fue adquirida por el pretratamiento de acidificación y congelación en la mazorca de maíz (*Zea mays* L.).

Chico H. & Sandoval D. (2015). Investigaron la proporción enzimática de β -glucosidasa y celulasa para la producción azúcares reductores totales o también conocido como ART desde la cascarilla de arroz. En el cual se aplicó un pretratamiento de NaOH al 8% por 85 min y a 121°C, donde se pudo eliminar 66.55% de lignina de la muestra inicial. Además, las proporciones enzimáticas se plantearon manipulando un DCCR, donde la celulasa (1-5%) es el primer factor y la β -glucosidasa (0.2 – 0.6%) es el segundo, por un plazo de 48 h. concluyendo que las concentraciones de glucosidasa 0.2% y celulosa al 5%, se determinó 17.146 g/L de ART más elevadas que las demás y por último se ejecutó una fermentación para obtener bioetanol.

Bardales C.; Rojas C. & León C. (2015). Evaluaron los importantes residuos lignocelulósicos en La Libertad, con la finalidad de establecer su potencial como biomasa para la fabricación de bioetanol de segunda generación. Procediendo a establecer, ubicar y posteriormente determinar su potencialidad para la producción de bioetanol a través de la determinación de ART, para posteriormente analizar en una hidrólisis química, física y fisicoquímica, manejando agua destilada, ácido sulfúrico e hidróxido de sodio al 1.25% en una proporción partícula solvente 1:10. Concluyeron, que la provincia de Virú, es la que genera la mayor cantidad de residuos lignocelulósicos como son; mazorca de “maíz amarillo duro”, la hoja de “caña de azúcar”, coronta de “maíz” y cascarilla de “arroz”.

Córdoba M., & Molina M., (2014). Tuvieron como objetivo establecer las proporciones de celobiasa, celulasa y del NaOH en el rastrojo de piña (Ananas Comusus, variedad MD2). Se le ejecutaron diferentes proporciones de NaOH y distintos tiempos hallándose que el resultado más elevado le pertenece al tiempo de 25 min. De las muestras resultantes con NaOH al 1% y 1.25% (m/v); la proporción de la hidrólisis con celulasa comprende de 20, 15 y 10 FPU/g entre 9:1, 7:1 y 5:1 de celobiasa (v:v), proporcionalmente no encontraron significancia sobre las proporciones del NaOH y en cuanto a la celobiasa/celulasa, por ende se concluye que la proporción de NaOH al 1% y la relación de enzima al 7:1, teniendo logros de la producción de etanol al 1.87% v/v.

Niño *et al.*, (2013). Investigaron la diferencia entre las reacciones químicas del H_2O_2 , H_2SO_4 y NaOH; estableciendo parámetros de respuesta en ART posteriormente del proceso de hidrólisis enzimático a residuos de yuca y el % de lignina eliminada después de las reacciones químicas. La biomasa utilizada (1 y 5%) a partículas de (1.18 y 0.6 mm) se pretrató aislado (hojas y tallos), estos se hidrolizan con accellerase 1500. En conclusión, el NaOH permitió una elevada obtención de ART con un (3.7 g/L) en hojas, H_2O_2 (1.54 g/L) y H_2SO_4 (2,11g/L); en las demás partes se obtuvo concentraciones bajas de ART.

López *et al.*, (2009) Optimizaron la producción de ART generados por el aserrín de pino, para este aprovechamiento se examinaron pretratamientos como la explosión de vapor a °T de autoclave, ácido y alcalino; encontrando que a 120 °C el hidróxido de sodio brinda excelente producción de ART a comparación de los demás. Además, manifiesta que la producción excelente de ART con 48%, le pertenece al pretratamiento con un 8% de hidróxido de sodio por 85 min., 4.5 pH y una concentración enzimática de 25 UPF/g. concluyendo que el pretratamiento alcalino es el que origina los rendimientos más altos de azúcares reductores totales, desarrollando una obtención a partir del aserrín de pino a etanol para la industria automotriz.

II. MARCO TEÓRICO

Por otra parte, la cascarilla de arroz es una fibra vegetal pequeña que cubre naturalmente el arroz para aislarla del entorno, asimismo está compuesta por un alto contenido de sílice y celulosa que brindan un perfecto beneficio como recurso energético (Valverde et al., 2007). Además, según Chico H. & Sandoval D. (2015) nos indica que es un subproducto de la agroindustria arroceras que empieza con la etapa de recolección y secado del arroz cáscara, que posteriormente serán enviados a los molinos, donde aquí se deriva a la desinfección y selección del grano, para posteriormente ser procesado en una cadena de maquinarias que cuentan con el propósito, primeramente, de extraer la cáscara, para finalmente pasar por un raspado y cepillado. En este penúltimo proceso se consigue un producto secundario nombrado como cáscara de arroz o cascarilla de arroz.

En consecuencia, de esto, el porcentaje de residuos obtenidos del arroz son abundantes. Según Huaraz C. (2013), señala que la especie que se cultiva mayormente en el Perú es la "*Oryza Sativa*", teniendo como residuo principal la cascarilla de arroz con un 20 - 22%, polvillo 5 - 7%, Nielen 0.7 - 1%, arrocillo 1 - 2% y grano de arroz 68 - 73%.

Según el INIA, (2012) "Instituto Nacional de Investigación Agraria", las primordiales variedades que son sembradas en los valles arroceros del Perú son un aproximado de 30 variedades y la gran parte se producen del PIA-Perú (Programa de Investigaciones en Arroz-Perú). Las variedades de arroz que se cultivan en nuestro país son las siguientes: Oro, santana, R43, costa norte, Sicán, INIA 502 - Pítipo, INIA 508 - Tinajones, INIA 510 - Mallares, todas estas variedades en Derecho público, así también hay en Derecho privado que son las variedades: Urpi, NIR -5, NIR-6.

Por otro lado, la producción internacional de arroz según la FAO (2017), nos muestra que en el continente asiático se ha concentrado la mayor producción mundial de arroz con 682.1 millones de toneladas; seguido de África con 31.1 mill de toneladas; en América del sur 25.5 mill de toneladas; América del norte con 8.1

mill de toneladas; Europa con 4.1 mill de toneladas, América central con 2.9 mill de toneladas y Oceanía con un 0.8 mill de toneladas.

Además, en la producción nacional según Huaraz C. (2013), la consecuencia de las arroceras, es la generación de altos volúmenes de biomasa lignocelulósica, y está en aumento; por otra parte, el estado peruano radica en amplificar el cultivo y en consecuencia se elevarán la obtención de arroz. Además, según el Ministerio de Agricultura y Riego (2017), nos indica que estamos incrementando la producción de arroz en el Perú, ya que en el 2016 se produjo 3, 166, 000 Ton y en el 2017 se produjo 3, 045,000 Ton. De acuerdo a Huaraz C. (2013) nos indica que el 20% es cascarilla, por ende, en el 2016 se generó 633 200 ton y en el 2017 se generó 609 000 ton de cascarilla de arroz.

Dado la significancia de producción y acopio, ocurren diversos ensayos hacia la utilización de cáscara de arroz en distintas áreas y con otros métodos, para conseguir que la materia prima se maneje de modo inmediato y directo o pasando por fases previas que posibiliten el uso posterior del material pre tratado. Según Abelardo & Caroll, (2010). Las prácticas más selectas son: Obtención de etanol por vía fermentativa; Tostado para uso como sustrato en el cultivo de flores; Generación de energía (ladrilleras, secado de arroz y cereales); Combustión controlada para uso como sustrato en cultivos hidropónicos; Obtención de concreto, cemento y cerámicas; Aprovechamiento de la cascarilla de arroz en compostaje y como lecho filtrante para aguas residuales; Obtención de materiales adsorbentes; Fuente de sustancias químicas (carboximetilcelulosa de sodio, dióxido de SiO₂, Nitruro de silicio, furtural); Producción de aglomerados (tableros); Material aislante en construcción; Cama en avicultura, porcicultura y en transporte de ganado y Ceniza en cultivo (frutas)

También es necesario conocer que según Córdoba M. & Molina M. (2014), los materiales lignocelulósicos son un recurso opcional que se apuntan a no mostrar inconvenientes como los componentes de almidón que son utilizables para elevadas producciones; además estos en su estructura están conformadas por

celulosa, hemicelulosa y lignina. Esta hemicelulosa y celulosa a través de la aplicación de enzimas se logran convertir en azúcares fermentables o también conocidos como ART.

Asimismo, para Chico H. & Sandoval D. (2015), uno de los materiales lignocelulósicos en abundancia en el Perú es la cáscara de arroz que presenta una estructura de (15 al 20%) hemicelulosa, (15 al 20%) lignina y (35 al 40%) de celulosa, por lo que es considerado una biomasa adecuada en la obtención de ART para la fabricación de etanol, dado la disponibilidad y asequibilidad. Y también para Valverde, (2012) deduce que los parámetros derivados de la investigación a nivel mundial pertenecen a que la lignina se conforma de (18.20 – 24.60%), celulosa (25.89 – 39.05%) y hemicelulosa (18.10% – 27.06%) de la cascarilla de arroz o cáscara de arroz.

La celulosa $C_6H_{10}O_5$, es el constituyente principal de la biomasa lignocelulósica, que consiste en una cadena lineal de D-glucosa unida por enlaces β -(1,4)-glicosídicos entre sí. Estas cadenas de celulosa se relacionan juntas para producir fibrillas de celulosa que están unidas por un número de moléculas intermoleculares por enlaces de hidrógeno (Li *et al.*, 2010). Por lo tanto, la celulosa es insoluble en el H_2O y en la totalidad de las soluciones orgánicas (Swatloski *et al.*, 2002).

La hemicelulosa $C_5H_8O_4$, se localizan en las paredes celulares secundarias, son biopolímeros ramificados heterogéneos que contienen pentosas (β -D-xilosa, α -L-arabinosa), hexosas (β -D-manosa, β -D-glucosa, α -D galactosa) y / o ácidos orgánicos (α -D-glucurónico, α -D-4-O-metilgalacturónico) y ácidos α -D-galacturónicos) (Girio *et al.*, 2010). Ellos son relativamente fáciles de hidrolizar debido a su amorfo y ramificada estructura (con cadena lateral corta), así como su menor peso molecular (Li *et al.*, 2010). Las hemicelulosas son relativamente sensibles al movimiento condición, en consecuencia, los parámetros tales como retención el tiempo y temperatura debe ser controlado para impedir la formación de indeseados tales como furfurales e hidroximetil furfurales que más tarde inhibe el proceso de fermentación (Palmqvist E. & Hahn B., 2000)

La lignina $[C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0.9-1.7}]^n$ es un polímero tridimensional aromático sintetizado a partir de precursores de fenilpropanoides. El principal químico con unidades de fenilpropano que consisten principalmente en siringilo, guaiacilo y p-hidroxifenol, estos están unidos por un conjunto de vínculos para hacer una matriz complicada, rígida estructuralmente por endurecimiento. (Demirbas A., 2008)

Las características microestructurales según Askeland, D. & Fulay P., (2010). Definieron el nivel de organización interna que permite distinguir detalles estructurales a una escala microscópica que se le conoce como “microestructura” observables a través de una microscopía óptica o electrónica de barrido etc., con un margen de resolución: 1 a 100 micras. Según Abanto et al. (2015), la observación microscópica accede al cálculo de la superficie proyectada de la partícula y a la vez se realiza una valoración a sus 2 formas dimensionales. Normalmente la tercera dimensión se considera sólo si se cuenta con un microscopio de barrido eléctrico. De esta manera se logra percibir una dimensión mínima de 0.001 μm . Además, es una técnica perfecta para ver el tamaño de la partícula directamente, lo que le permite juzgar la correlación de dispersiones.

Los azúcares reductores totales para Chico H. & Sandoval D. (2015) los azúcares reductores totales o también llamados ART se nombran sistemáticamente azúcares a polisacáridos, disacáridos y monosacáridos, estos habitualmente poseen una sensación dulce, sin embargo, en generalizaciones se entiende a cualquier hidrato de carbono; ya que están constituidos únicamente de hidrógeno, oxígeno y carbono. Además, nos menciona que los azúcares reductores son aquellos azúcares que cuentan con un intacto (grado funcional), y que cuenten con un equilibrio con otras especies.

Los pretratamientos de los residuos lignocelulósicos según Chico H. & Sandoval D. (2015) describieron que el propósito del pretratamiento se basa en la ejecución de una previa preparación a los residuos, por medio de reacciones químicas, ejecuciones físicas y mecánicas, así elevamos la producción de hidrólisis en la cascarilla de arroz.

Para Salazar *et al.*, (2010) mencionan que los pretratamientos correctos de los residuos agroindustriales se logran percibiendo 4 fases que se puede apreciar mediante el análisis microscópico: Desplazamiento / remoción del cubrimiento de la lignina; Deja al manifiesto / remoción de la hemicelulosa; Reducción / eliminación de la cristalización de los fragmentos de celulosa y Aumento de porosidad en los materiales.

El objetivo del pretratamiento físico como molienda, astillado, congelación, radiación es extender el espacio de superficie y reducir el tamaño de partícula de los residuos lignocelulósicos (Harun *et al.*, 2012). Por otra parte, conduce a reducir el nivel de polimerización y descristalización de la materia prima (Mood *et al.*, 2013).

Por consiguiente, el pretratamiento de congelación es un enfoque novedoso desarrollado recientemente para el pretratamiento físico de biomasa y se ha encontrado que aumenta elocuentemente la digestibilidad de la enzima. A pesar del alto costo involucrado y de que solo unos pocos estudios han llevado a cabo usando este pretratamiento hasta el momento, sus características únicas, es decir, menor impacto ambiental negativo, aplicación de menos productos químicos peligrosos y de alta eficacia han atraído a una gran oferta de atención (Chang *et al.*, 2011).

Por otro lado, el pretratamiento alcalino se utiliza para la eliminación de lignina, grupos acetilos y diferentes sustituciones de ácido urónico que inhiben la accesibilidad de celulosa, estos son las ventajas más cruciales de este pretratamiento (Li X., Kim T. & Nghiem N. 2010). Además, la solubilización de hemicelulosas y celulosa en este método es menor que en los procesos ácidos o hidrotermales (Carvalho F., Duarte L. & Gírio F. 2008). Además, este método es conocido por causar hinchazón química de fibra celulosa (Mosier *et al.*, 2005) (Chang M. 2000), en la que ocurren reacciones de saponificación y salvación que conducen a la interrupción de los enlaces cruzados entre las hemicelulosas y los otros componentes, por lo tanto, aumentando la porosidad de biomasa (Sun y Cheng 2002).

Y finalmente el pretratamiento físico químico según Sánchez O., & Cardona C., (2005) nos informa que se caracterizan porque son una combinación de la acción hidrolítica de radicales ácidos con procesos de descompresión instantánea que causa la ruptura de la estructura del material lignocelulósico. También, para Mood *et al.*, (2013) indicaron que varios métodos de pretratamiento poseen unos inconvenientes que limitan sus aplicaciones. Pero estos pretratamientos combinados se han apreciado recién como una perspectiva prometedora para sobresalir este desafío, aumentando la eficacia de producción de azúcar, disminuyendo la formación de inhibidores y acortamiento tiempo de procesamiento. Estos resultados colectivamente resultarán en un mayor bioetanol rendimiento y un proceso más económico.

En el proceso de hidrólisis el fundamento es la inversión de celulosa a glucosa, que se transforman utilizando procesos enzimáticos o como químicos. En la actualidad una nueva elección en nuestra actualidad es el empleo de enzimas que están preparados para hidrolizar celulosa y transforman la glucosa a etanol (Almenares *et al.*, 2011).

El proceso utilizado en la siguiente investigación fue la hidrólisis enzimática que según Alvira & Tomás P, (2010), es una de las estrategias para la elaboración de jarabes fermentables a partir de polisacáridos complejos como la celulosa y el almidón. De acuerdo a Ovando S., y Waliszewski, K. (2005), este proceso se logra a través del manejo de celulosas de la cual son específicas. Demostrando un resultado obteniendo ART, conteniendo la glucosa. Estas celulasas son un conjunto de varias enzimas, la β -1,4-glucosidasa; la endo- β -1,4-glucanasa y la exo- β -1,4glucanasa. Además, para Chico H. y Sandoval D. (2015), el costo de aprovechamiento de esta, en la hidrólisis es económico a diferencia de la hidrólisis ácida ya que se trabaja a 4.8 de pH y entre 40 y 50°C y no cuenta inconvenientes de corrosión.

La enzima celulasa (EC.3.2.1.4), de acuerdo a Zegarra R. (2000), estas hidrolizan β (1, 4) glucano en una pared de celulosa, degradando a unas moléculas de

glucosa. Esta no es una enzima separada, excepto que cuenta con un sistema enzimático que posee por lo menos 3 actividades. El componente de los sistemas celulolíticos se alejan continuamente en moléculas de azúcar iniciando por la β (1,4) glucano y las de tipo endo que operan sin distinción sobre los enlaces glicosídicos β (1,4). La tercera y última se diferencia por un sistema celulítico la celobiasa por lo que se nombra β (1 - 4) dimerasa o celobiasa. En estos sistemas el pH varía entre 6 y 4 por lo general.

Sus usos de la celulosa y sus resultantes son los materiales esenciales en la industria. Esta celulosa bacteriana es un material encantador para diferentes aplicaciones, los cuales varían según las propiedades que tengan (Dumitriu, 2004; Higson, 2011). En las industrias se usan para la industria del papel, medicina, farmacéutica, alimentación, cosmético, entre otras (Chawla *et al.*, 2009).

Por consiguiente, se formuló el siguiente problema: ¿Cuál es el efecto del pretratamiento alcalino, congelación y de ambos sobre las características microestructurales y el rendimiento de obtención de azúcares reductores totales de la cascarilla de arroz (*Oryza sativa l.*) durante el proceso de hidrólisis con celulasa (EC:3?2.1.4.)?

La propuesta de este proyecto es manejar fuentes lignocelulósicas de fácil acceso a su producción y elevada recepción, como la cascarilla de arroz en el Perú; para incrementar el rendimiento de la hidrólisis enzimática con celulosa que se requiere de previos pretratamientos para que posteriormente por un proceso de fermentación lleven a obtener productos utilizables como el biocombustible o energías verdes de segunda generación (el bioetanol) y además como una materia prima de provecho industrial.

Además, se busca que las fuentes lignocelulósicas obtenidas de la agroindustria consiguen ser apreciadas como una biomasa. Ya que las obtenciones de este tipo de biomasa se ubican en sitios bastante definidos, y su acopio consigue provocar consecuencias de deterioro del medio ambiente y contaminación. También esta biomasa se convierte en una opción para minimizar las emisiones de dióxido de carbono y asimismo es amigable con el ambiente.

La disponibilidad de esta fuente lignocelulósica como una biomasa de subproductos del sector agroindustrial cerciora un material módico y abundante, considerando que el % de biomasa originados está en aumento, se optó por el interés del incremento del rendimiento de la hidrólisis enzimática con celulasa a través de previos pretratamientos para el aprovechamiento de la cáscara de arroz y luego ser usado como una nueva fuente de energía para nuestro país.

Se planteó como objetivo general: Evaluar el efecto del pretratamiento alcalino, congelación y de ambos sobre las características microestructurales y el rendimiento de obtención de azúcares reductores totales de la cascarilla de arroz (*Oryza sativa L.*) durante el proceso de hidrólisis con celulasa (E.C:3.2.1.4.).

Así mismo se planteó los siguientes objetivos específicos: Determinar la caracterización química como: pH, humedad y cenizas de la cascarilla de arroz (*Oryza sativa L.*); Determinar la concentración de componentes lignocelulósicos de la cascarilla de arroz, antes y después del pretratamiento alcalino, congelación y de ambos; Comparar las características microestructurales de la cascarilla de arroz (*Oryza sativa L.*) antes y después del pretratamiento alcalino, congelación y de ambos; Determinar los azúcares reductores totales producidos después del proceso de hidrólisis con celulasa (E.C:3.2.1.4.) a partir de la cascarilla de arroz (*Oryza sativa L.*) y Determinar el efecto del pretratamiento alcalino, congelación y de ambos sobre las características microestructurales y el rendimiento de obtención de azúcares reductores totales de la cascarilla de arroz (*Oryza sativa L.*) durante el proceso de hidrólisis con celulasa (E.C:3.2.1.4.). Como hipótesis tenemos, que el efecto de la combinación del pretratamiento alcalino y congelación tendrán notables características microestructurales y un mayor rendimiento de obtención de azúcares reductores totales de la cascarilla de arroz (*Oryza sativa L.*) durante el proceso de hidrólisis con celulasa (E.C: 3.2.1.4.).

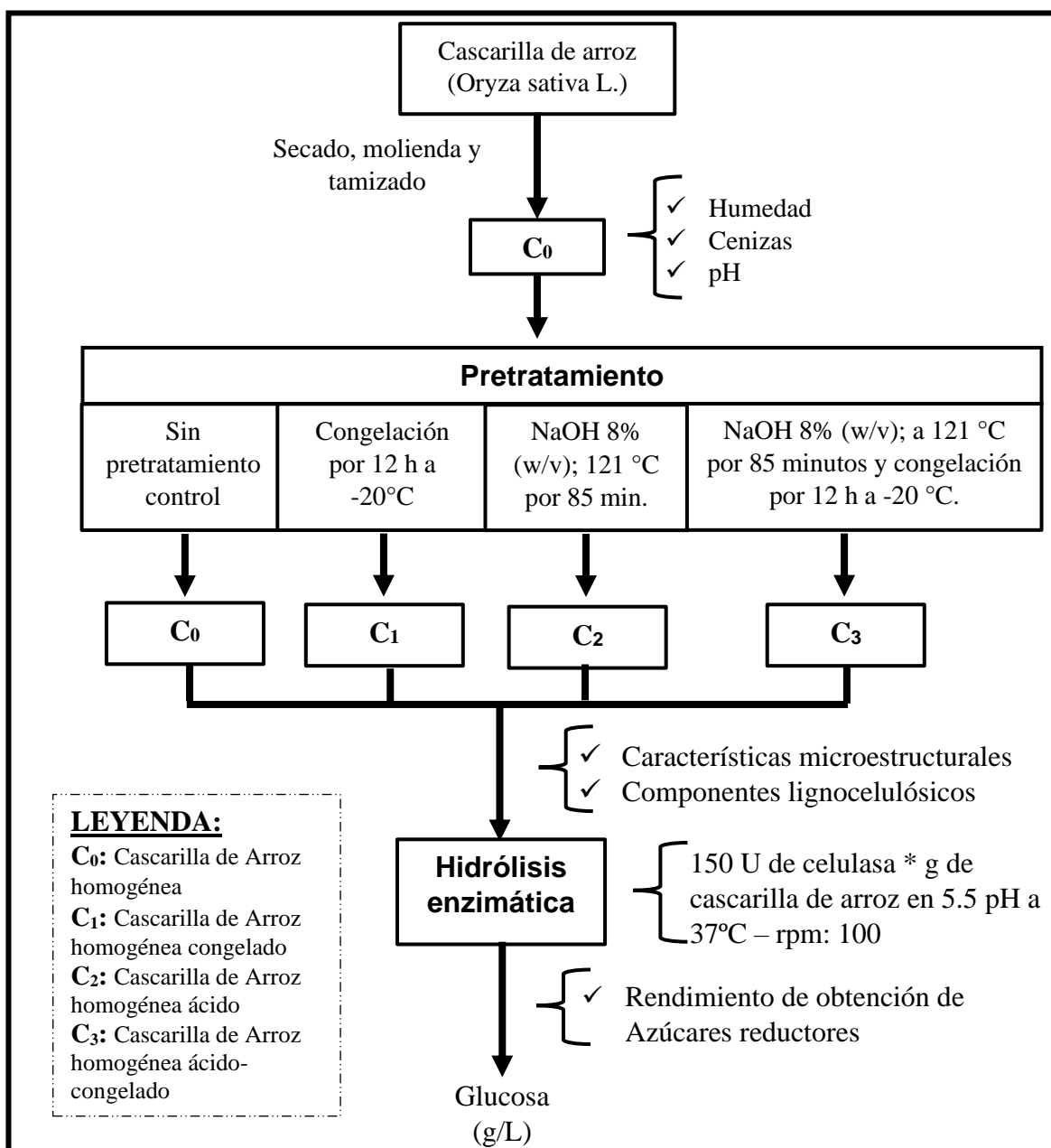
III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo y diseño de investigación

El tipo de diseño de investigación es experimental

2.1.1. Diseño de investigación

Para La cascarilla de arroz homogénea fue pretratada según se muestra en el siguiente esquema experimental expuesto a continuación:



Fuente: Elaboración propia

Figura 1 Diseño de los diferentes pretratamientos en la obtención de ART en la cascarilla de arroz.

En la anterior figura 1., se representa un diseño para determinar el efecto de los diferentes pretratamientos en las características microestructurales y, así mismo, el rendimiento de la producción de azúcares reductores totales después de la hidrólisis enzimática con la enzima celulosa, *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, EE. UU); además de compararlos con la muestra patrón y otras investigaciones de su semejanza.

3.2. Operacionalización de variables

Variable independiente

- Pretratamientos

Variables dependientes

- Características microestructurales
- Rendimiento de obtención de azúcares reductores totales (ART)

Variable interviniente

- Componentes lignocelulósicos

Tabla 1. Operacionalización de las variables de investigación.

Variables	Dimensiones		Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Escala de medición
Independientes	Pretratamientos	Alcalino	Los medios alcalinos eliminan la lignina, además producen un hinchamiento de la biomasa, también una declinación de la cristalización y dispersión de la estructura entre la hemicelulosa y lignina (Chang <i>et al.</i> , 2000).	Se utilizó el NaOH al 8% por 85 min a 121°C en una proporción 1:10 (w/v); para posteriormente el sólido separar para poder filtrar y secar.	NaOH al 8% por 85 min. a 121 °C	Cualitativo nominal
		Congelación	Pretratamiento físico que aumenta la digestibilidad de la enzima. A pesar del alto costo involucrado, teniendo un menor impacto ambiental negativo y una alta eficacia (Chang <i>et al.</i> , 2011).	Se preparó en una proporción de 200mg de C ₀ /5ml de acetato de sodio por 1h y posteriormente se congeló a -10°C por 24h. Y por último se secó a 60°C por 12h.	-10 °C por 24 h	Cualitativo nominal
		Alcalino y congelación	Según Mood <i>et al.</i> , (2013), nos indica que los pretratamientos combinados aumentan la eficiencia del azúcar producido, también disminuye la formación de inhibidores y acortan el tiempo de procesamiento.	Primeramente, se hidrolizo con NaOH al 8% por 85 min a 121 °C y posteriormente se congelo a -10 °C por 24 h y por último se filtró y secó.	NaOH al 8% por 85 min. a 121 °C y -20 °C por 12 h	Cualitativo nominal
Dependientes	Características microestructurales		Según Abanto <i>et al.</i> , (2015), la observación microscópica accede al cálculo de la superficie proyectada de la partícula y manejando este método puede obtener una dimensión tan reducido como 0.001 µm.	Los cambios microestructurales para las muestras pretratadas se observaron por un microscopio electrónico por el método de Verdugo J. (2017).	Presencia: Anchura en mm	Cuantitativo por razón

Fuente: Elaboración propia

		Rendimiento de obtención de azúcares reductores totales	De acuerdo a Chico H. & Sandoval D. (2015) son aquellos azúcares que cuentan con un intacto (grupo funcional) y están compuestos de hidratos de carbono.	Se cuantificó cada muestra pretratada por un tiempo de 12h durante 60h del hidrolisis usando el método de 3.5 ácido Dinitrosalicílico (DNS). Para posteriormente transformarlos en glucosa (g/L).	$\frac{mg\ Glucosa}{g\ de\ Sustrato}$	Cuantitativo por razón
Intervinientes	Componentes lignocelulósicos	Celulosa	Es el constituyente principal de la biomasa lignocelulósicos, que es un polisacárido de cadena lineal unida por enlaces β - (1,4) – glicosídicos entre sí (Li et al., 2010).	Para determinar la celulosa se utilizó la norma ANSI/ASTM (American National Standatds Institute, 1997).	% Celulosa	Cuantitativo por razón
		lignina	Es un polímero tridimensional sintetizado aromático a partir de precursores de fenilpropanoides, que están unidos para hacer una matriz complicada y rígida (Demirbas A., 2008).	Se determinó la lignina por el método TAPPI 222 (American National Standatds Institute, 1997).	% Lignina	Cuantitativo por razón
		Hemicelulosa	Son biopolímeros ramificados heterogéneos que contienen pentosas, hexosas o ácidos; además son relativamente fácil de hidrolizar debido a su amorfo y ramificado estructura (Li et al., 2010).	Primero se determinó la holocelulosa por (Browming, 1967); y posteriormente por diferencia del % de celulosa y la holocelulosa se puede obtener la hemicelulosa.	% Hemicelulosa	Cuantitativo por razón

Fuente: Elaboración propia

3.3. Población y muestra

Población

La República (2017), nos indica que en nuestro departamento de La Libertad. Las estadísticas de la Oficina de Información Agraria de la Gerencia Regional de Agricultura, manifestaron que La Libertad ha ocupado un cuarto lugar en la producción de arroz, posteriormente de San Martín, Piura y Lambayeque.

Consecutivamente La Libertad consiguió una producción de 206,857 toneladas, siendo las provincias de Chepén (97,768 t) y Pacasmayo (92,381 t) las de mayor producción. A comparación con el 2016 hubo una pequeña producción por el fenómeno que nos aconteció en el 2017.

Muestra

Se utilizó un kilogramo de una sola variedad de arroz cáscara (*Oryza sativa* L.), las cuales fueron adquiridas de una arrocera “San Francisco” ubicado en La Libertad, distrito de huanchaco; con un muestreo al azar, en un estado de residuo arrocero y además de que esta muestra no cuente con presencia de plaga alguna u otras partículas que no sean nuestra materia prima.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad

2.4.1 Técnicas de recolección de datos

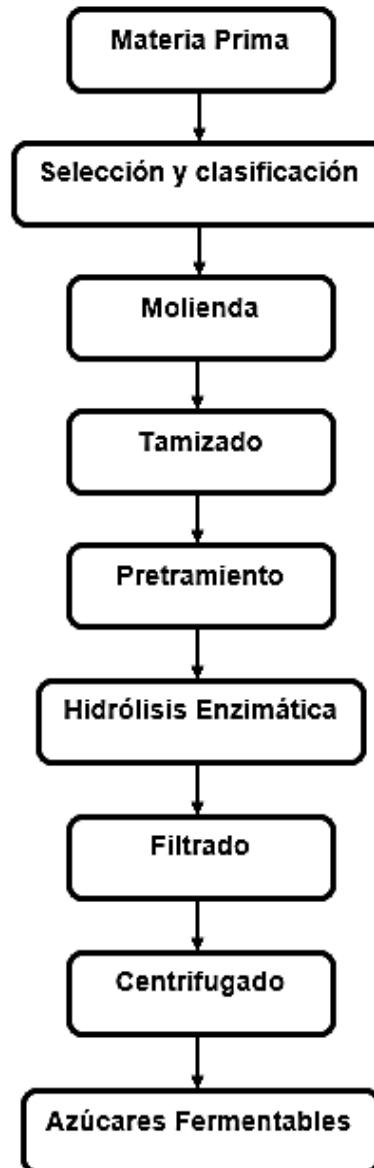
a) Análisis de caracterización de la materia prima

- Humedad a través del método de AOAC 7003, 1980. (Ver anexo 1)
- Cenizas según el método AOAC 923.03, 2005. (Ver anexo 2)
- pH mediante el método potenciómetro AOAC 981.12, 2000 (Ver anexo 4)
- Celulosa por la norma (ANSTI/ASTM, 1977). (Ver anexo 6)

- Holocelulosa por el método de (Browning, 1967) y por diferencia con la celulosa se podrá determinar la hemicelulosa. (Ver anexo 5)
 - lignina se determinó por el método de (American National Standards Institute, 1977). (Ver anexo 7)
- b) Análisis de los pretratamientos
- Determinación del pretratamiento físico según la metodología descrita por Chang *et al* (2010). (Ver anexo 10)
 - Determinación del pretratamiento químico según la metodología de López *et al.*, (2009). (Ver anexo 10)
 - Determinación del pretratamiento fisicoquímico por la combinación de pretratamientos antes mencionados. (Ver anexo 10)
- c) Análisis de características microestructurales
- Según la metodología descrita por Verdugo J. (2017). (Ver anexo 3)
- d) Hidrólisis enzimática
- Según la metodología descrita por Chang *et al* (2010) y Baadhe *et al.*, (2014). (Ver anexo 10)
- e) Determinación del rendimiento de azúcares reductores totales
- a. Obtención de azúcares reductores totales
 - Determinación por el método de 3.5 Ácido Dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). (Ver anexo 8)
 - b. Determinación de celulosa a glucosa
 - Determinación por el método de Dussán *et al.*, (2014) (Ver anexo 9)

3.5. Procedimiento

Ah este residuo lignocelulósico deshidratado se ejecutó el estudio de Azúcar reductores totales (ART) por el método de DNS, para contar con una data inicial llamada muestra control de manera que no intervenga en el efecto de la etapa hidrolítica.



Fuente: Elaboración propia

Figura 2 Flujograma de la obtención de ART de la cascarilla de arroz.

Descripción del proceso experimental

a) Materia prima:

Se manejó la variedad NIR-I de la cascarilla de arroz procedente de la costa Liberteña (La Libertad, Perú) en la ejecución de esta investigación.

b) Selección y clasificación de la materia prima:

Se ejecutó una clasificación con el fin de comprobar que la biomasa procedente, no cuente con ninguna presencia de partículas extrañas y hongos.

c) Molienda:

La materia prima seca fue molida en un molino manual Bach (Corona, Perú), para conseguir partículas finas homogéneas.

d) Tamizado:

Con el fin de lograr partículas más finas homogéneas se tamizó con un tamiz N° 60 (U.S.A. Standard Test Sieve, EE.UU.), con una partícula de 0.250 mm; donde se disuelve sin dificultades con agua y permitió en el hidrólisis una mayor superficie de contacto.

e) Pretratamiento:

En este proceso se sometió a la cascarilla de arroz ya homogénea a diferentes pretratamientos. A situaciones de altas temperaturas como la reacción química de NaOH al 8% (w/v) a 121 °C por 85 min. En una proporción de 1:10 (g de sustrato/ml de la solución alcalina). Y además a bajas temperatura como la congelación (Indurama CI- 409, Perú) por 12h a -20°C y por último a la combinación de ambos pretratamientos iniciando con el pretratamiento alcalino y seguidamente el de congelación.

f) Hidrólisis enzimática:

La hidrólisis se trabajó a una concentración de [150 U de celulasa *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, EE.UU.)] / [g de cascarilla de arroz en 10 ml de 50 mM en un medio de acetato de sodio], entre los parámetros de 5.5 de pH y 37 °C de Temperatura determinados por los investigadores anteriores; en un orbital (Shaker, BS-GS-30) a 100 rpm por 60 horas (Chang et al., 2010 y Baadhe et al., 2014).

g) Filtrado:

Se filtró el sobrenadante para disminuir el total de sólidos de nuestra muestra.

h) Centrifugado:

De los pretratamientos se tomaron los sobrenadantes filtrados y se llevaron a centrifugar a una velocidad de 4800 rpm por 15 minutos.

3.6. Métodos de análisis de datos

Se trabajó con el modelo lineal general ANOVA (Análisis de varianza) con una significancia del 95% con un valor p de diferencia significancia de ($p < 0.05$) para la caracterización microestructurales y el rendimiento de obtención de azúcares reductores totales, para evaluar el efecto de diferencias significativas entre los pretratamientos.

Si en el ANOVA se encuentra diferencia significativa de ($p < 0.05$) para cada resultado, se tendrá que efectuar un estudio de uniformidad de varianzas calculando el estadístico de Levene, seguido de una prueba de post-hoc de TUKEY para valorar las diferencias significativas entre tratamientos. Estos análisis fueron determinados usando el SPSS ((Programa Estadístico de Ciencias Sociales, SPPS Corporation, IL, USA) para Windows.

3.7. Aspectos éticos

Esta investigación está comprometida a no manejar productos químicos ni agentes contaminantes que apoyen al deterioro del medio ambiente, sino de contribuir que los residuos agroindustriales tengan un nuevo aprovechamiento para el uso energético para nuestro planeta. Además, las técnicas de análisis hacia la elaboración de resultados en la investigación se ejecutarán conforme a las normas señaladas como también descritas por los autores de diferencias investigación referenciando adecuadamente y utilizándose apropiadamente.

Sin embargo, los datos deberán ser verdaderos, tal cual resultaron en los métodos de los análisis sin correcciones a beneficio del investigar. En conclusión, se conservarán el respeto por las ideologías morales, religiosas y políticas; jurídicas y responsabilidad social.

IV. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA CASCARILLA DE ARROZ HOMOGÉNEA

La Tabla 2. Presentó la composición química de la cascarilla de arroz, en el cual la hemicelulosa y la celulosa forman un abundante potencial para la producción de biocombustibles, como además es importante conocer el menor % lignina porque puede ser una barrera en el transcurso de la hidrólisis.

Tabla 2. Composición química de la cascarilla de arroz homogénea.

Composición química	Experimental (%)	Loja, C. (2017)	Torres et al. (2016)	Arias R. & Meneses J. (2016)	Chang et al (2010)	Valverde et al (2007)
Humedad	4,44 % ± 0,0023	6 %	-	6,59 % ± 0,1612	-	-
Cenizas	14,14 % ± 0,0022	16 %	17,7 % ± 0,1	18,52 % ± 0,3652	-	-
pH	6,08 % ± 0,0058	-	-	5,74 ± 0,0472	-	-
Celulosa	37,28 % ± 0,3729	45 %	34,4 % ± 0,1	36.03 % ± 0.9866	41,06 %	25.89 % – 39.05
Hemicelulosa	28,28 % ± 0,2279	11%	9,5 % ± 0,2	45,48 % ± 1.0796	13.88 %	18.1 % – 27.06
Lignina	14,69 % ± 0,147	28%	22,1 % ± 0,4	18.49 % ± 0.2296	25.33 %	18.20 % – 24.6

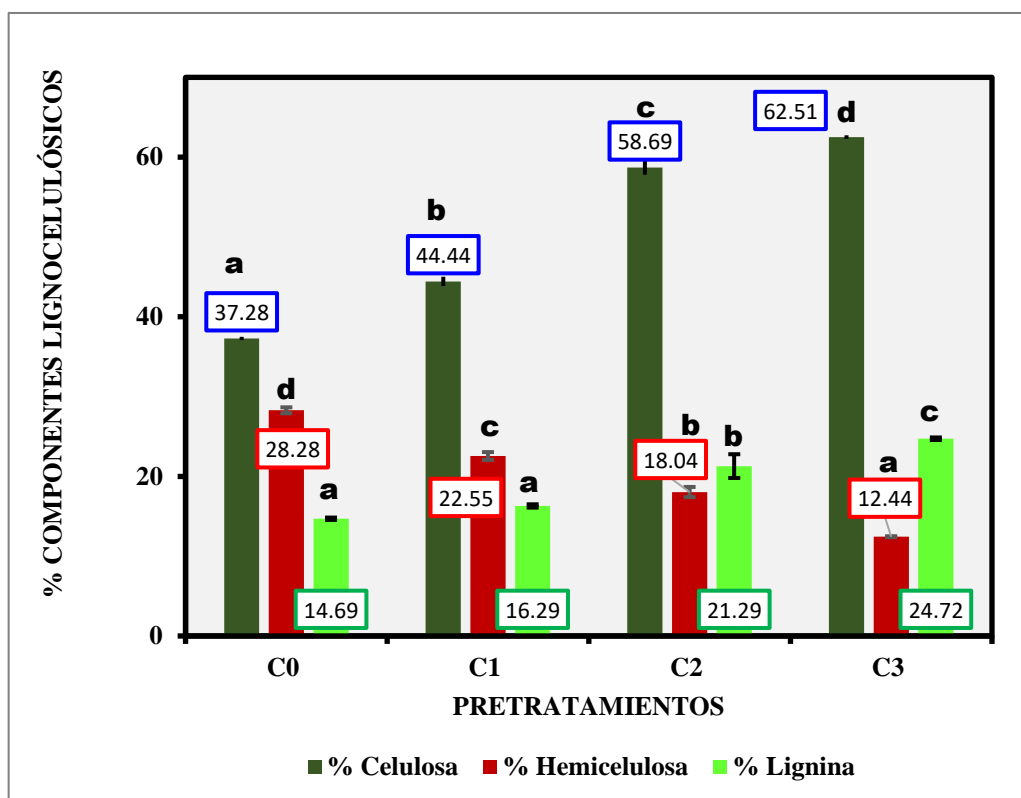
Fuente: elaboración propia.

Puesto que en la tabla 2 los datos reportados por las investigaciones, comparados a los resultados obtenidos, nos indica que nuestros valores de componentes químicos coinciden con sus resultados y además se encuentran dentro del rango internacional (Valverde *et al.*, 2007).

En relación de la desviación estándar (σ o s), los valores se hallan inferiores al 5% lo que le indica que son aceptables (Focer, 2002).

4.2 COMPONENTES LIGNOCELULÓSICOS DESPUÉS DE LOS PRETRATAMIENTOS

En la figura 8 se identificaron los resultados producidos después de los diferentes pretratamientos a la cascarilla de arroz homogenizada, los diferentes pretratamientos a analizar son: físico (congelación “C₁”); químico (alcalino con NaOH 8% “C₂”) y físico-químico (alcalino con NaOH 8% y Congelación “C₃”).



Fuente: Elaboración propia

Figura 3 Componentes lignocelulósicos de la cascarilla de arroz después de diferentes pretratamientos.

En la figura 8 se observó que el mayor valor de %Celulosa (62,51%) fue para el pretratamiento C₃; además %Hemicelulosa (12,44%) también mostró un valor mínimo en el pretratamiento C₃ y en el caso del menor valor de %Lignina (14,69%) fue para el pretratamiento C₀ en comparación con los demás pretratamientos.

En la tabla 2 se puede observar las comparaciones con otras investigaciones de los distintos pretratamientos aplicados dentro de nuestra investigación.

Tabla 3. Estructura lignocelulósica de la cascarilla de arroz después de los pretratamientos y la comparación con otras investigaciones.

Pretratamientos	Autor	Componentes Lignocelulósicos		
		% Celulosa	% Hemicelulosa	% Lignina
C ₁	Este estudio	44,44% ± 0,487	22,55% ± 0,534	16,29% ± 0,207
C ₂ (NaOH8%)		58,69% ± 0,637	18,04% ± 0,694	21,29% ± 1,487
C ₃		58,69% ± 0,061	12,44% ± 0,228	24,72% ± 0,159
C ₁	Chang <i>et al.</i> , (2010)	71,86 %	-	-
C ₂ (NaOH8%)	Chico L., & Sandoval D., (2015)	-	-	6.52%
C ₂ (NaOH10%)	Torres <i>et al.</i> (2016)	44,2% ± 2,4	6,8% ± 0,8	%16,2 ± 2
C ₂ (NaOH10%)	Sanches N., (2018)	42,2 % ± 2,68	-	-

Fuente: Elaboración propia

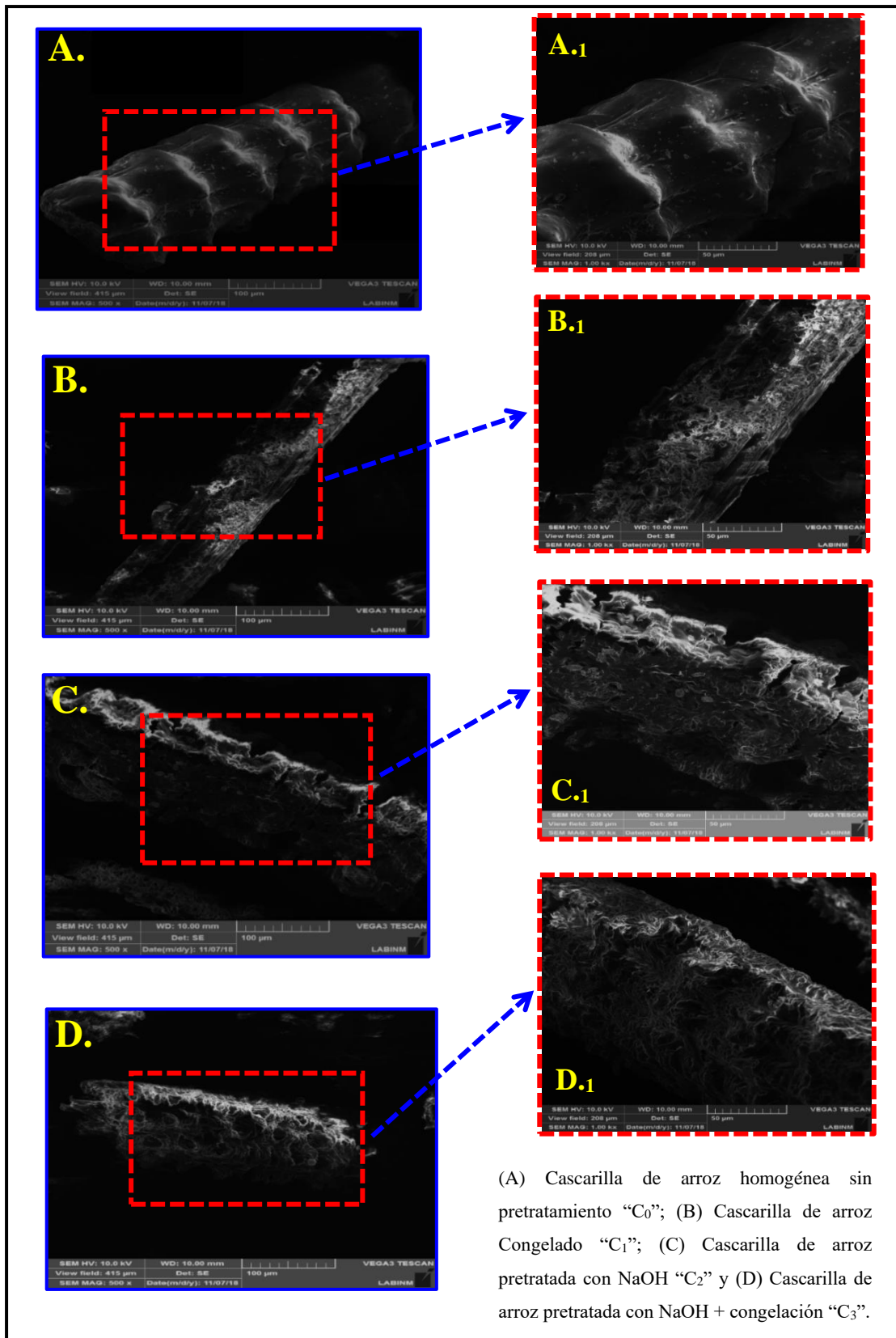
*Estadísticamente no se encontró diferencia significativa entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

Se observa en la tabla 3 que estadísticamente el análisis ANOVA unifactorial no hay diferencia significativa entre los grupos de celulosa, hemicelulosa y lignina de acuerdo con los tratamientos usados ($p < 0,05$).

El % Celulosa obtenido por el pretratamiento de Congelación de nuestro estudio se encontró una diferencia del 27,42% menor a lo reportado por (Chang *et al.*, 2010); por otro lado, el pretratamiento Alcalino de nuestra investigación tuvo mejores resultados en % Celulosa, a diferencia del %Hemicelulosa y % de Lignina.

4.3 CARACTERÍSTICAS MICROESTRUCTURALES

En la Figura 9 se muestra micrográficas de la cascarilla de arroz homogénea antes y después de los diferentes pretratamientos; estas muestras fueron observadas por un microscopio electrónico de barrido y se clasificó las fotografías con las siguientes letras (A-D).



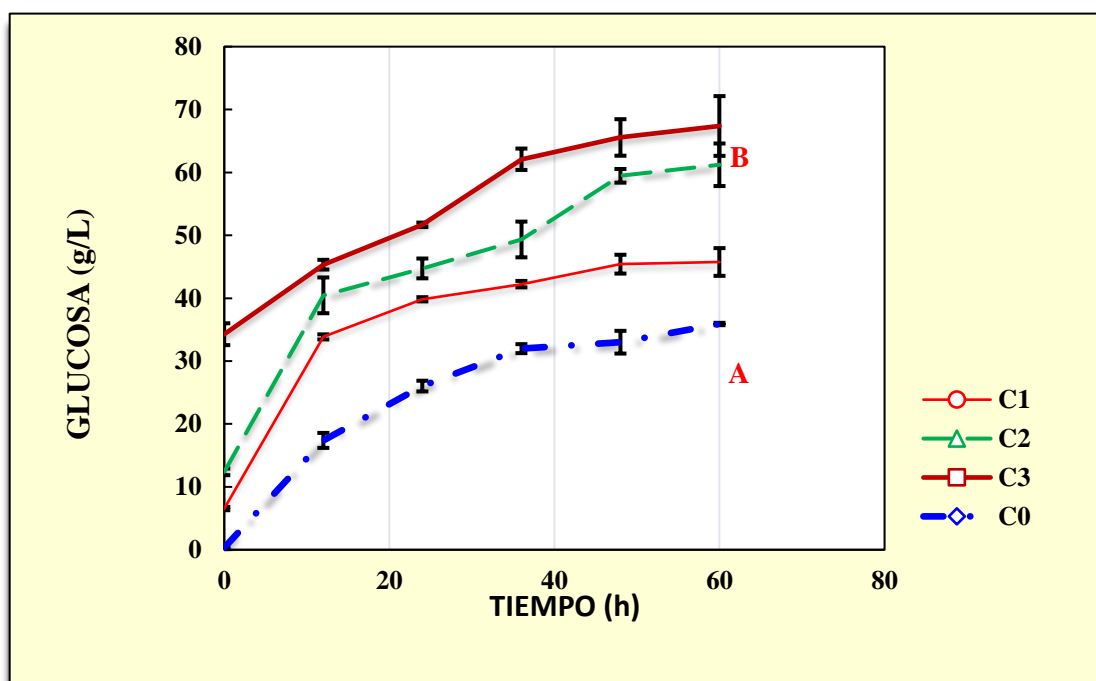
Fuente: Elaboración propia

Figura 4 Micrografías de la cascarilla de arroz homogénea sin pretratamiento y después del pretratamiento.

Como se observa en la figura 9, los cambios morfológicos de la cascarilla de arroz con los diferentes pretratamientos, se pueden apreciar claramente la diferencia, además que estadísticamente el ancho de las cascarillas de arroz antes y después de los pretratamientos si hay diferencia significativa ($p < 0.05$). Obteniendo que las mezclas de los pretratamientos hacen someter a la materia lignocelulósica más expuesta para la hidrólisis enzimática.

4.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La siguiente figura modela la producción de glucosa liberado por el proceso de hidrólisis utilizando Celulasa de *Aspergillus niger* 1.18 U/mg sólido durante 60



horas.

(C₀) cascarilla de arroz Sin Pretratamiento; (C₁) Cascarilla de arroz congelada; (C₂) cascarilla de arroz con NaOH y (C₃) Cascarilla de arroz congelada + NaOH.

Figura 5. Concentración de glucosa obtenida por la hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz con diferentes pretratamientos.

A continuación, en la tabla 4, se percibe el cotejo de la glucosa producida por la transformación de hemicelulosa y celulosa durante 60 horas de hidrólisis con la enzima Celulasa.

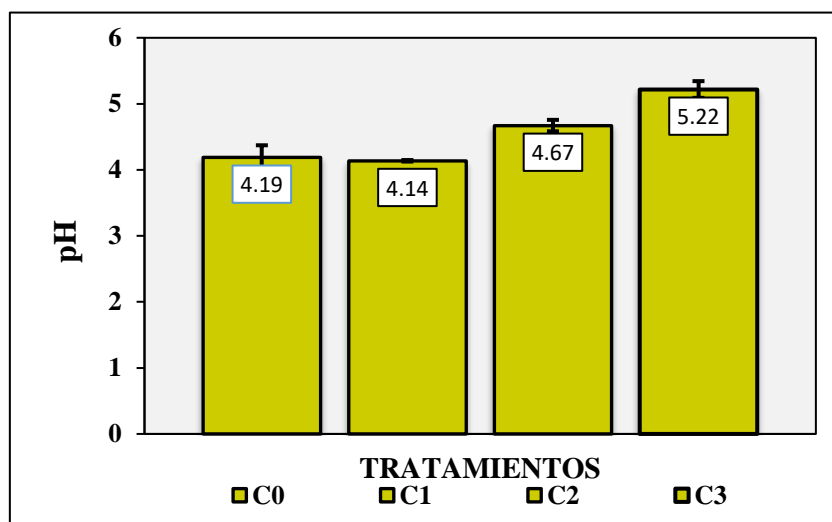
Tabla 4. Concentración de glucosa originada por la hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz.

Pretratamientos	0	12	24	36	48	60
C ₀	0,33 0,119 ^a	± 17,39 1,191 ^a	± 26,02 0,852 ^a	± 31,98 0,714 ^a	± 33 ± 1,808 ^a	35,9 0,186 ^a
C ₁	6,55 0,256	± 33,85 0,403	± 39,82 0,333	± 42,23 0,510	± 45,41 1,496	± 45,76 2,206
C ₂	12,39 0,528	± 40,46 2,847	± 44,73 1,574	± 49,34 2,841	± 59,46 1,086	± 61,21 3,384
C ₃	34,27 1,739 ^b	± 45,33 0,772 ^b	± 51,67 0,355 ^b	± 62,09 1,702 ^b	± 65,56 2,906 ^b	± 67,38 4,751 ^b

Fuente: Elaboración propia

*El ANOVA unifactorial indica que hay diferencias en la concentración de glucosa después, de acuerdo con los tratamientos usados ($p < 0.001$)

La mínima cantidad de glucosa durante las 60 h. de hidrólisis fue para “C0 (Sin pretratamiento)”, obteniendo $35,9 \pm 0,186$ g/L y el mayor contenido de glucosa lo obtuvo el “C3 (Congelación + Alcalino)”, obteniendo $67,38 \pm 4,75$ g/L. El factor que interrumpió en el rendimiento de glucosa, fue el cambio de pH durante el proceso de hidrólisis enzimática como se puede llegar a apreciar en la figura 11 el sin pretratamiento y con pretratamiento en especial el de congelación y por Alcalinidad se encuentran por debajo del 5.5 pH reportado por Chang *et al* (2010), a diferencia del pretratamiento fisicoquímico que su pH final es de 5,22, es por eso que obtenemos unas mejores conversiones de glucosa.

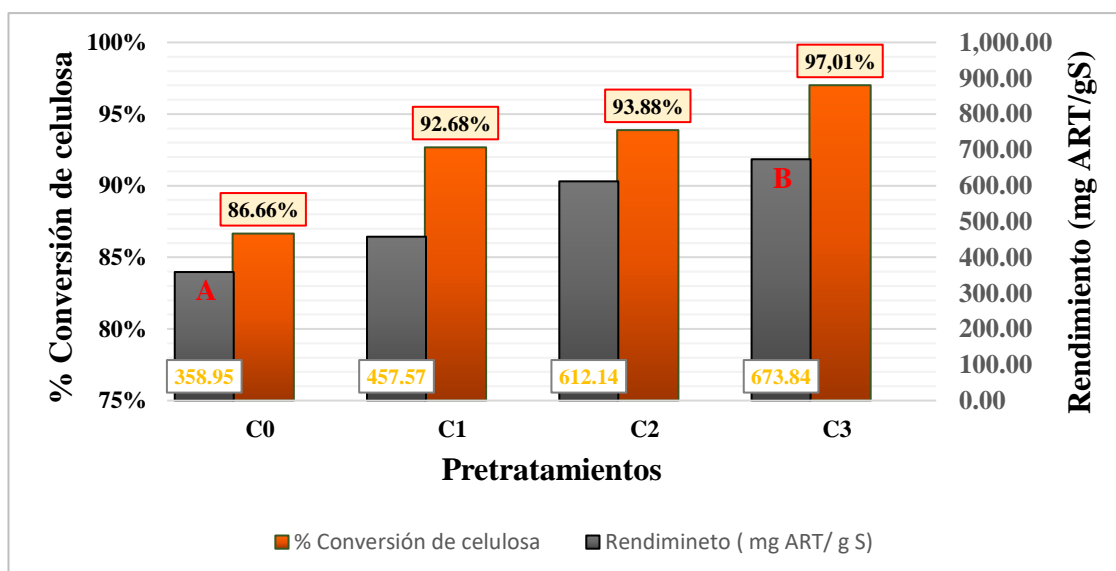


Fuente: Elaboración propia

Figura 6 PH del hidrolizado final para los distintos pretratamientos.

4.5 RENDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES TOTALES

En la siguiente figura se aprecia el % de conversión de celulosa y el rendimiento ($\text{mg}_{\text{Glucosa}}/\text{g}_{\text{Sustrato}}$) para los diferentes pretratamientos realizados a la cascarilla de arroz.



Fuente: Elaboración propia

Figura 7 Transformación de celulosa a glucosa después del hidrolisis enzimático.

En la figura 12 se considera que el menor % de conversión de celulosa es para el “C₀ (Sin pretratamiento)”, obteniendo 86,66% a diferencia del “C₃ (Congelación + Alcalino)”, que obtuvo un 97,01% de conversión, demostrando una diferencia significativa entre cada pretratamiento. Además, el rendimiento de glucosa se aprecia una mayor producción en el pretratamiento C₃ con 673,84 **mg_{glucosa}/g_{sustrato}** y el menor rendimiento es el C₀ con 358,95 **mg_{glucosa}/g_{sustrato}**.

Se ejecutó un ANOVA unifactorial, con un nivel de 95 %de confianza con un valor-p de significancia de $p < 0.05$ para el rendimiento de obtención de Azúcares Reductores Totales, para calcular la diferencia significativa entre pretratamientos, encontrándose significancia en el ANOVA ($p < 0.05$), se pasó a realizar una siguiente prueba post-hoc de TUKEY, para fijar quiénes de los tratamientos difieren entre los otros. Estos análisis se realizaron usando SPSS versión 22.0 para Windows. Ver en el (Anexo 12).

V. DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se realizó una caracterización fisicoquímica a la cascarilla de arroz, en el cual los resultados de la composición varían de acuerdo a su estación, técnicas de cosechas, entre otros factores (Silverstein, R., 2007): El % humedad se obtuvo $4,44\% \pm 0.0023$ y el promedio de la cascarilla de arroz varía entre el 8 a 15 % después de un secado al sol (Arias, R. & Meneses, J. 2016). Confrontando con el resultado obtenido, estamos por debajo de los datos reportados, esto debido a que en la ciudad de Trujillo la temperatura es muy cambiante por las épocas de verano, es por ello que la cascarilla de arroz se encuentra libre de humedad y puede tener un mejor manejo como residuo en diferentes áreas. Según (Focer, 2002), manifiesta que es indispensable indicar que en la transformación energética el sustrato debe contener un 30% menor de humedad. De acuerdo a los resultados nos encontramos con una buena calidad de materia prima que cumple con los estándares para el manejo de la obtención de energía verde.

La cascarilla de arroz en cuanto a cenizas se obtuvo $14.14 \pm 0.002\%$, este valor se encuentra aproximadamente cerca a los rangos expuestos por Loja, C. (2017) y Arias R. & Meneses J (2016). Señala que las cenizas determinan la parte inorgánica de calcio, magnesio, sales y potasio, además la sílice se encuentra en la cáscara del cereal. Así también (Morillas R. & Delgado A. 2012) menciona que después de la incineración de la muestra quedó materia inorgánica, lo cual indica que la cantidad de ceniza que queda no es combustible por cada kilogramo de muestra.

Por otro lado el contenido de pH se obtuvo $6.08\% \pm 0.005$, este dato es importante porque influye en el proceso enzimático en la obtención de azúcares reductores totales con la enzima Celulasa *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, EE.UU), además para el acondicionamiento de la hidrólisis se requiere un medio ácido entre 5.5 de pH; en los resultados obtenidos nos damos cuenta que el pH de la muestra puede adaptarse a bajar aún medio ácido sin dificultar alteraciones para la formación de azúcares reductores (Chang *et al.* 2010).

Además, la Tabla 2 muestra los porcentajes de lignina, hemicelulosa y celulosa: $14,69 \pm 0,147$; $28,28 \pm 0,228$ y $37,28 \pm 0,373$, respectivamente; como se observa el % de celulosa es superior que el contenido de lignina como demuestran todas las investigaciones previas. Comparados con los resultados por (Valverde et al., 2007), nos indica que estamos dentro del rango de la obtención de componentes lignocelulósicos de la cascarilla de arroz; si se encontrara mucha diferencia en algunos de sus componentes; Arias R. & Menes J. (2016) nos indica que se debe a la probabilidad de la variedad de arroz y a las labores agronómicas, además cabe resaltar que el mayor porcentaje de celulosa influye y contribuye en aumentar el rendimiento en la obtención de azúcares reductores totales como la glucosa en los diferentes tipos de pretratamientos.

Por otro lado, se encontró que el porcentaje de lignina, del polímero aromático de una estructura tridimensional, compleja y ramificada no coincide con lo reportado por Chang *et al.*, (2010), ya que la diferencia del auto es mayor al 25.33 %; a diferencia de los demás reportes de investigación se muestran que nuestro resultado se encuentra dentro de los parámetros trabajados por Arias R. & Menes J. (2016) y Valverde et al (2007).

Con respecto a la composición de la cascarilla de arroz "*Oryza Sativa*" referente al % hemicelulosa, % lignina y % celulosa reportada en la tabla 2, permite establecer, que esa biomasa agroindustrial tiene concentraciones adecuadas, siendo las dos primeras fuentes importantes de carbohidratos, hidrolizables para obtener azúcares simples, útiles como fuente de sustrato en procesos biotecnológicos orientados a la fabricación de alcohol.

Después de que la cascarilla de arroz homogénea la ha sido pretratada se puede observar en la figura 8 que el pretratamiento por congelación y de alcalinidad con NaOH por separado, muestra que el porcentaje de celulosa aumenta, observándose un aumento de lignina y una disminución de la hemicelulosa. A comparación con todos los pretratamientos los notables cambios de los componentes lignocelulósicos se facilitaron en el pretratamiento físico-químico, lo cual se puede observar un mejor aspecto de celulosa ($62,51 \pm 0,061$), una mayor

degradación de hemicelulosa ($12,44 \pm 0,228$) y un aumento de lignina ($24,72 \pm 0,159$).

Los pretratamientos que aumentan la digestibilidad de la fuente lignocelulósica son: térmicos, mecánicos, alcalinos, ácidos y las combinaciones de estos (Chico H. & Sandoval D. 2015). Sin embargo, los pretratamientos químicos aplicando ácidos degradan mayor contenido de celulosa, pero no precisamente transformándolos en azúcares si no que transforman en otro tipo de materias originarias de la lignina que puede impedir un imprevisto transcurso de fermentación.

Otro caso, la pérdida de lignina en los componentes lignocelulósicos se puede cargar a la consecuencia que cuenta el pretratamiento alcalino de modificar o remover, beneficiando la penetrabilidad de las enzimas y optimizando la digestibilidad de la celulosa Chico H. & Sandoval D. (2015); sin embargo, la efectividad del pretratamiento con NaOH depende del tiempo, concentración y tiempo.

Finalmente, el pretratamiento aplicado con NaOH permite un aumento de celulosa de 37,28% de C0, sin pretratamiento a 62,51% de la muestra pretratada C3. Según Chico H. & Sandoval D. (2015); manifiesta en su investigación que cuenta con aumento del componente de celulosa, pero, además menciona que el componente de lignina disminuye notoriamente en el proceso del pretratamiento, a comparación de nuestra investigación no se encontró esa disminución del % de lignina.

En cambio, en el pretratamiento de congelación los resultados indican un menor contenido de celulosa a comparación del pretratamiento NaOH, pero siempre mayor que el de sin pretratamiento, porque el pretratamiento físico disminuye la partícula, aumentado el área asequible y los poros disminuyen el grado de descristalización y polimerización del sustrato (Sun y Cheng, 2002 y Harun et al., 2011). A comparación de otros datos, la compleja estructura del sustrato lignocelulósico no se fragmenta sencillamente utilizando una sola técnica de congelación (Jeong *et al.*, 2016). El incremento de la lignina posterior a los pretratamientos se logra manifestar por las diferencias características

fisicoquímicas, como son la condensación y fusión de lignina o la agrupación de pseudo-lignina por la mezcla de carbohidratos formados en la fragmentación de hemicelulosa y productos de degradación de lignina (Zheng *et al.*, 2015).

Pero para Chang *et al.*, (2010) que realizó un estudio con el pretratamiento por congelación aumento elocuentemente la digestibilidad enzimática del 48% al 84% de la cáscara de arroz. De acuerdo con el efecto, de la paja de arroz; comparado con nuestros resultados también tenemos una digestibilidad de 37% a 45%, esto se debe a la variedad de arroz que tenemos en nuestra ciudad de Trujillo, Perú; pero sí encontrando diferencia significativa con la muestra sin pretratamiento.

Las diferencias morfológicas de la cascarilla de arroz antes y después de los pretratamientos son visibles y medibles. En la figura 9 (A) la estructura de la cascarilla de arroz se muestra el tejido epidérmico rígido y ordenado debido a la apariencia de hemicelulosas amorfas en su área (Córdoba M. & Molina M. 2014), así mismo mostrando la apariencia de células interrumpidas debido al cruce de los componentes del sustrato (lignina, celulosa y lignina) (Mood *et al.*, 2013).

En la figura 9 (B) se observa que el pretratamiento de congelación posee un tejido rígido en forma de red cristalina y la ruptura del tejido sigue el mismo sentido de la planta. En específico, el pretratamiento por congelación es una perspectiva de pretratamiento físico que maneja los inicios del agua; expone la densidad del agua baja, su volumen se propaga cuando se congela y cuando pasa a la descongelación es donde se origina las grietas dentro de la estructura del sustrato. Esta propiedad se ha experimentado primariamente para el almacenamiento y conservación de los alimentos (Hong *et al.*, 2013 y Noh *et al.*, 2006). Simultáneamente, escasas investigaciones encontramos sobre las consecuencias de la congelación en biomasa lignocelulósicos. A desigualdad de (Chang *et al.*, 2010), que pudo optimizar la transformación enzimática con el pretratamiento de congelación sobre la cascarilla de arroz. Encontrándose que el proceso de congelación de la biomasa optimizó los rendimientos de hidrólisis enzimática acrecentando el espacio superficial de respuesta y la sociabilidad enzimática en la biomasa pretratada.

En la figura 9 (C) el pretratamiento alcalino se detecta que el NaOH 8% agrandó el espacio de la cascarilla de arroz sin tratar, debido a que existe una mayor distribución de su estructura, asimismo de manifestarse menor aglomeramiento e irregular debido tal vez a la supresión de hemicelulosa. Kahar et al., (2010) ejecutaron investigaciones de la morfología, observándose que el pretratamiento con NaOH y en autoclave podría fragmentar la rigidez estructural de las matrices de lignocelulosa de la fibra y hacer muchos microporos en el interior. Esto significó que la superficie de la fibra se aumentó significativamente por la descomposición de las matrices de hemicelulosa de las microfibrillas de celulosa.

Finalmente, en la figura 9 (D) la combinación de los pretratamientos se observa menos aglomerada y muy particionada, observándose una distribución en forma de red cristalina irregular; esto ocurrió por la supresión de hemicelulosa y la dispersión de las fibras de la estructura lignocelulósica, debido primeramente al pretratamiento con NaOH y además del acrecentamiento del grosor de poros debido al pretratamiento por congelación. Chang *et al.* (2010).

Estadísticamente la anchura de la cascarilla de arroz pretratada y sin pretratamiento si se encuentra diferencia significativa, ya que la anchura mayor promedio le pertenece al C₀ (0,153 ± 0,003) y la menor a C₃ (0,085 ± 0,005); dando una clara respuesta de una destrucción del tejido lignocelulósico.

Las cascarillas de arroz homogénea de los pretratamientos estuvieron sometidas a hidrólisis con celulasa de *Aspergillus niger* de 1.13 U/mg durante 60 horas a 100 rpm, 37 °C y 5,5 pH. Confrontando la digestibilidad enzimática de las muestras, observamos que la C₃ reflejó ser más apta a la hidrólisis enzimática. En la figura 10 se logró determinar la producción de glucosa (g/L) de las muestras pretratadas, a través de las 60 h de hidrólisis enzimática. La concentración mayor de glucosa fue a las 60 h de hidrólisis para la C₃ los cual fue de 62,093 ± 1,702 g/L. En la figura 4, se logra apreciar que también existen diferencias significativas (p<0.05) entre cada pretratamiento.

El mínimo contenido de glucosa durante las 60 h de hidrólisis fue para la C₀, la cual consiguió 35,895 ± 0,186 g/L, este resultado se iguala a estudios ejecutados con

Chico H. & Sandoval D. (2015). En la figura 11 del hidrolizado final se aprecia que el pH final para el pretratamiento C₃ se mantuvo su pH con $5,22 \pm 0,13$ a diferencia de los otros pretratamientos que disminuyeron sus pH finales. Este cambio se originó principalmente al desarrollo de compuestos no esperados durante la fragmentación de hemicelulosa y lignina, como anteriormente se mencionó, y está claro que las condiciones óptimas para una mejor actividad enzimática de la celulasa de *Aspergillus niger* está en el rango de 37 °C y 5.5 de pH. Las desviaciones de temperatura y pH, son los factores importantes que perturban la utilidad de la actividad catalítica enzimático procedentes por *Aspergillus Niger* (Costa et al., 2012).

En la figura 12 se observa la tasa de transformación de la celulosa a glucosa para cada pretratamiento posterior a las 60 horas de la hidrólisis enzimático. Para el mejor pretratamiento (C₃) la tasa de transformación de celulosa a glucosa fue de 97,01%, por otro lado, la muestra sin pretratamiento obtuvo una tasa de transformación de 86,66%. La menor tasa de transformación de celulosa a glucosa por los demás pretratamientos se pudo deber por el mayor contenido de lignina. La lignina restringe la velocidad de hidrólisis enzimática, impidiendo que las partes digeribles del sustrato sean hidrolizadas y actúen como un inhibidor. Las más afectadas son el componente de la celulosa por inhibición de lignina en comparación con las glucosidasas y xilanasas, debido a la asociación irregular entre la lignina y las enzimas celulolíticas (Esteghlalian *et al.*, 2001 y Berlin *et al.*, 2006).

Además, se aprecia en la misma figura 12 un mayor rendimiento por el pretratamiento C₃ (673,84 mg_{ART}/g_{sustrato}) a diferencia de los demás pretratamientos que estadísticamente se demuestra que si hay diferencia significativa en el rendimiento de obtención de ART. Y el menor rendimiento es para el sin pretratamiento C₀ (558,95 mg_{ART}/g_{sustrato}). El rendimiento de Azúcares reductores Totales es directamente proporcional a la conversión de glucosa encontrada en el proceso de hidrólisis enzimático.

La fermentación de estas porciones de azúcar alcanza a dar un rendimiento de etanol del 90% del máximo teórico, que es 0.51 g de etanol por g de azúcar (Lawford

y Rousseau, 2002). Consecuentemente, teniendo en cuenta la obtención de 673,84 mgGlucosa/gSustrato y la densidad del etanol es de 0.79 kg/L se tendría un rendimiento teórico de etanol a partir de la cascarilla de arroz de 0.392 LEtanol/KgSutrato. Estos resultados exponen claramente la potencialidad del uso de la cascarilla de arroz para la obtención de bioetanol.

VI. CONCLUSIONES

Concluimos que la cascarilla de arroz conserva un menor contenido de lignina ($14.69 \pm 0.15\%$), elevado % celulosa ($37.28 \pm 0.38\%$) y hemicelulosa ($28.28 \pm 0.23\%$); haciéndola una biomasa lignocelulósica potencialmente ventajoso para la obtención de azúcares.

Posteriormente de la combinación de los pretratamientos (Congelación + Alcalino) se observó un aumento en el %celulosa ($62.51 \pm 0.06\%$), menor cantidad de hemicelulosa ($12.44 \pm 0,28\%$) y una ampliación en el % lignina ($24.72 \pm 0.16\%$).

Se verificó que la microestructura del pretratamiento fisicoquímico “C3” a diferencia de los demás pretratamientos, esta es más fragmentada, y posee un menor aglomeramiento notándose una estructura en forma de red cristalina y asimismo una disminución de la anchura, como también un aumento en la porosidad.

Se determinó que el mayor rendimiento de azúcares reductores es del pretratamiento combinado C₃ (673,84 mg_{ART}/g_{sustrato}) y además del mejor porcentaje de conversión de celulosa con un 97.01%.

Estadísticamente, si hay diferencia significativa entre la relación del rendimiento de obtención de azúcares reductores totales, características microestructurales sobre los pretratamientos.

VII. RECOMENDACIONES

Se espera que estos resultados tomados en el microscopio electrónico, para los siguientes análisis se le realicen un recubrimiento de oro, carbono u otros metales de conducción de iones a las muestras trabajadas ya que mejorarían la visualización del campo por ende se mejoraría la observación de la microestructura.

Ejecutar la práctica de la hidrólisis enzimática en un biorreactor controlado y automatizado todas las variables posibles.

Evaluar otro tipo de pretratamientos ecológicos para la obtención de biocombustibles, como también a la exploración de reactivos amigables con el medio ambiente.

Obtener bioetanol a partir de la combinación de alcalinidad y congelación para ver si desarrolla la producción de bioetanol Real.

REFERENCIAS

ABANTO Rojas, Rita Norma; Anglas Capcha, Luis & Calzada Bustamante, Ketty, Análisis de tamaño de partículas: Método microscópico y de tamices, aplicaciones. Universidad Norbert wierner, Lima. 2015.

ABELARDO Prada, Caroll E. Cortés. La descomposición térmica de la cascarilla de arroz: una alternativa de aprovechamiento integral. Colombia. *Orinoquia*, 14 (1). 2010.

ALMARSODOTTIR, A. R; Sigurbjornsdottir, M. A. & Órlygsson, J., Effect of various factor son ethanol yields from lignocellulosic biomass by thermo anaerobacterium AK17. *Biotechnol Bioeng*, 109: 686-694 pág. 2012.

ALMENARES Verdecía, Juan Francisco; Ngoma Presline, Frande & Serrat Díaz, Manuel de Jesús. Aspectos tecnológicos generales para la conversión a etanol de la biomasa lignocelulósica II. *RTQ*, 31 (3): 392-407 pág. 2011. ISSN 2224-6185.

ALVIRA, P.; Tomàs-pejo, E.; ballesteros, M. & Negro, M., "Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review". *Bioresource Technology*, 101 (13): 4851-4861 pág. 2010.

ARIS Ortiz, Rosa Angèlica & Meneses Cruz, Juan Daniel. Caracterización físico-química de residuos agroindustriales (cascarilla de arroz y cascarilla de café), como materia prima potencial para la obtención de bioetanol, Laboratorios de quimic UNAN-Managua I-II semestre 2016. Tesis (Licenciado en Química Industrial) Managua - Nicaragua: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, 2016.

ASKELAND, Donald R. & Fulay, Pradeep P. *Fundamentos de ingeniería y ciencia de materiales*. Mexico : *Cengage Learning Editores*, S.A., 2010. ISSN: 978-607-481-340-1.

AVELLA, O. Etanol celulósico a partir de residuos agrícolas. Lima-Perú. 2009.

BAADHE, R., Potumarthi, R., Mekala, N. Influence of dilute acid and alkali pretreatment on reducing sugar production from corncobs by crude enzymatic method: A comparative study. *Bioresource Technology*. 162, 213–217. 2010.

BARDALES Vásquez Cecilia.; Rojas Ruiz Candace. & León Torres Carlos. Evaluación de los principales residuos lignocelulósicos agroindustriales del departamento de La Libertad, Perú como potenciales materias primas para la obtención de bioetanol. Trujillo-Perú. *Revista Arnaldoa*, 22 (1): 22–232 pág. 2015. ISSN: 1815-8242

BARRENA, V., Análisis de recursos biomásicos leñosos y de residuos para uso combustible, 2009.

BERLIN, A., Balakshin, M., Gilkes, N., Kadla, J., Maximenko, V., Kubo, S., Saddler, J.N. Inhibition of cellulase, xylanase and b-glucosidase activities by softwood lignin preparations. *J. Biotechnol.* 125, 2006. 198–209 pág.

CARVALHEIRO F.; Duarte L. C. & Gírio F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67: 849–64 pág. 2008.

CHANG Ken-Li, Jitladda Thitikorn-amorn, Hsieh Jung-Feng, Ou Bay-Ming, chen shan-He, Ratanakhanokchai Khanok, Huang Po-Jung & chen Shui-Tein. Enhanced enzymatic conversion with freeze pretreatment of rice straw. *Biomass and Bioenergy*, 35: 90-95 pág. 2010

CHANG, M. Holtzapfle. “Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity”. *Appl Biochem Bioethanol*, 86 5-37 pág. 2000.

CHAWLA, P. R.; Bajaj, I. B.; Survase, S. A. & Singhal, R. S. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 47(2): 107–124 pág. 2009.

CHICO León, Henry German & Sandoval Rojas, Daniel Alberto. Determinación de las concentraciones de enzimas Celulasa y β -Glucosidasa para la obtención de azúcares fermentables a partir de cascarilla de arroz. Tesis (Ingeniero Agroindustrial). Nuevo Chimbote: Universidad Nacional del Santa, 2015.17-150 pág.

CÓRDOBA Pérez Maureen y Molina Córdoba Manual. Determinación del efecto de la concentración de la celulasa, celobiasa y de NaOH en la hidrólisis para la

producción de etanol a partir del rastrojo de la piña. San José-Costa Rica. *Revista Ingeniería*, 24 (2): 35-51 pág. 2014. ISSN: 1409-2441

COSTA M., Torres M., Reyes., A. Caracterización de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* producidas en fermentación sólida sobre torta de canola. *Revista Colombiana Biotecnológica*. 24 (1), 2012, 208-215 pág.

DEMIRBAS A. Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: a review. *Journal of Hazardous Materials*, 157: 220–9 pág. 2008.

DUMITRIU, S. Polysaccharides, structural diversity and functional versatility (second). New York, USA: Marcel Dekker, Inc. 2004.

DUSSÁN K., Silva D., Moraes E., Arruda P., Felipe M. Dilute-acid Hydrolysis of Cellulose to Glucose from Sugarcane Bagasse. *Chemical Engineering Transactions*. 38, 433-438 pág. 2014.

ECHEVERRIA Carlos, Bazán Ghenghis, Sanchez Jesus, Ilescano Leslie, Pagador Sandra & Linares Guillermo. Pre-treatment by Acidification and Freezing on Corn cob Polymers and its Enzymatic Hydrolysis: *Asian Journal of Scientific Research*, 2017. 5-11 pág. ISSN: 1992-1454

ESTEGHLALIAN, A.R., Svivastava, V., Gilkes, N., Gregg, D.J., Saddler, J.N., An overview of factors influencing the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic feedstocks. In: Himmel, M.E., Baker, W., Saddler, J.N. (Eds.), *Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion*. ACS, pp.2001. 100–111pág.

FAO “Food and Agriculture Organization of the United Nations”. Seguimiento del Mercado del arroz de la FAO, 20 (4). 2017

FOCER, F. d. Manuales sobre energía renovables BIOMASAS. San José, C.R. 2002.

GIRIO F. M.; Fonseca C.; Carvalheiro F.; Duarte L. C.; Marques S. & Bogel-Lukasik R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, 101:4775–800 pág.2010.

HARUN M. Y.; Radiah A. B. D.; Abidin Z.Z. & Yunus R. Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Bioresource Technology*, 102: 5193–9 pág. 2011.

HONG H, Luo Y, Zhou Z, Bao Y, Lu H, Shen H. Effects of different freezing treatments on the biogenic amine and quality changes of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) heads during ice storage. *Food Chem.* 138 (2), 1476–82. 2013.

HUARAZ Choi, Carlos Yi. Diseño de un gasificador de 25 KW para aplicaciones domésticas usando como combustible cascarilla de arroz. Tesis (Ingeniero Mecánico). Lima: Pontificia Universidad Católica Del Perú. 2013. 13-20 pág.

I.E.A., 30 key Energy Trend in the IEA and worldwide. Paris. IEA. 35 pp. 2010.

INIA “Instituto Nacional de Investigación Nacional”. PNIA en arroz. Lima-Perú. Disponible: <http://www.inia.gob.pe/programas/arroz>. 2012.

IPCC, Climate change – 2011: The physical science basis. Summary for policymakers. Contribution of working group I to the Fourth Assessment Report of the IPCC. Ginebra: IPCC. 2011. 21 pág.

JEONG H., Jang S., Kim H., Yeo H., Choi J., Choi I., 2016. Effect of freeze storage on hemicellulose degradation and enzymatic hydrolysis by dilute-acid pretreatment of Mongolian oak. *Fuel*. 165, 145-151.

JI, Guanya, Gao; Chongfeng; Xiao, Weihua & Han, Lujia. Mechanical fragmentation of corncob at different plant scales: Impact and mechanism on microstructure features and enzymatic hydrolysis. Beijing–China. *Bioresource Technology*. (205): 159–165 pág. 2016.

KAHAR, P., Taku, K., Tanaka, S., 2010. Enzymatic digestion of corncobs pretreated with low strength of sulfuric acid for bioethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 110, 453–458.

KOOTSTRA, A., Differential effects of mineral and organic acids on the kinetics of arabinose degradation under lignocellulose pretreatment conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 43: 92-97 pág. 2009

LA REPÚBLICA . La Libertad ocupa cuarto lugar en producción de arroz. [En línea] Grupo la República (GLR), 27 de 10 de 2017. [Citado el: 15 de 05 de 2018.] <https://larepublica.pe/economia/1136850-la-libertad-ocupa-cuarto-lugar-en-produccion-de-arroz>.

LAWFORD, H., Rousseau, J. Performance testing of *Zymomonas mobilis* metabolically engineered for cofermentation of glucose, xylose, and arabinose. In: *Biotechnology for fuel and chemicals*. Humana Press, 429–48 pág. 2002.

LI M. F.; Fan Y. M.; Xu F.; Sun R.C. & Zhang X. L. Cold sodium hydroxide/urea-based pretreatment of bamboo for bioethanol production: characterization of the cellulose rich fraction. *Industrial Crops and Products*, 32: 551–9 pág. 2010.

LI X.; Kim T. H. & Nghiem N. P. Bioethanol production from corn stover using aqueous ammonia pretreatment and two-phase simultaneous saccharification and fermentation (TPSSF). *Bioresource Technology*, 101: 5910–6 pág. 2010.

LOJA Sánchez, Carlos Patricio. Optimización de los residuos de cascarilla de arroz mediante pretratamiento por hidrólisis ácida para la obtención de azúcares reductores. Tesis (Ingeniero química). Cuenca-Ecuador: Universidad de Cuenca. 2017. 25-80 pág.

LÓPEZ Miranda Javier; Soto Cruz Nicolás O.; Rutiaga Quiñones Olga M.; Medrano Roldán Hiram & Arévalo Niño Katuska. Optimización del proceso de obtención enzimática de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino, 25 (2): 95-102 pág. 2009.

M. Taherzadeh, K. Karimi. "Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review". *Int. J. Mol. Sci.* Vol. 9. 2008. pp. 1621-1651.

MILLER GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 420- 428 pág. 1959.

MINAGRI "Ministerio de Agricultura y Riego. Informe del arroz Dirección de estudios económicos e información Agraria Abril. 1–9 pág. 2017.

MOOD, S.; Golfeshan, A.; Tabatabaei, M.; Jouzani, G.; Najafi, G.; Gholami, M. & Ardjmand, M., Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27: 77- 93 pág. 2013.

MORILLAS Ruiz, J., & Delgado Alarcón, J. M. (2012). Análisis nutricional de alimentos vegetales con diferentes orígenes: Evaluación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales. *Nutricion clinica y Dietetica Hospitalaria*, 32(2), 8-20.

MOSIER N.; Wyman C.; Dale B.; Elander R.; Lee Y.Y.; Holtzapple M. & Ladisch M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96: 673–86 pág. 2005.

NIÑO López, Lilibeth; Acosta Cárdenas, Alejandro & Gelves Zambrano, Ricardo. Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), Medellín-Colombia. *Revista facultad de ingeniería Universidad de Antioquia*, (69): 317-326 pág. 2013. ISSN: 0.120-6230.

NOH E, Kang C, Hong S, Yun S., 2006. Freezing of soybeans influences the hydrophobicity of soy protein. *Food Chem.* 97(2), 212–6.

OVANDO, S., & Waliszewski, K. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. (U. J. Tabasco, Ed.) *Universidad y Ciencia*, 21(042): 113-122 pág. 2005.

PERÚPETRO, Informe anual de la producción de combustibles año (2011- 2012), 2012.

PALMQVIST E. & Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates.I. Inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, 74: 17–24 pág. 2000.

SALAZAR, Aguirre Oriana; Carmona Cerda René; Asenjo de Leuze Juan & Carlesi Jara Carlos. Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: Hidrólisis ácida y líquidos iónicos. Tesis (Ingeniero química y biotecnología). Santiago-Chile: Universidad de Chile facultad de ciencias físicas y matemáticas.2010. 12-133 pág.

SÁNCHEZ Oscar Julián & Cardona Carlos Ariel. Producción biotecnológica de alcohol carburante I. Obtención a partir de diferentes materias primas. *INCI*, 30 (11): 671-678. 2005. ISSN 0378-1844.

SILVERSTEIN, R.A., 2007. A comparison of chemical pretreatment methods for converting cotton stalks to ethanol. *Bioresource Technology*. 98, 3000–3011.

SUN Y. & Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production. *A review Bioresource Technology*, 83:1 pág. 2002.

SWATLOSKI R.P.; Spear S. K.; Holbrey J.D. & Rogers R. D. Dissolution of cellulose with ionic liquids. *JACS*, 124(18): 4974–5 pág. 2002

VALVERDE Agustín, Bienvenido Sarria. Análisis comparativo de las características fisicoquímicas de la cascarilla de arroz. Colombia. 2012.

VALVERDE Agustín, Sarria López Bienvenido & Monteagudo Yanes José P. Análisis comparativo de las características fisicoquímicas de la cascarilla de arroz. *Scientia et Technica*, 5 (37): 255-260 pág. 2007. ISSN 0122-1701.

VERDUGO Vergara, José Francisco. Bioadsorción de Iones de plomo y cromo procedentes de agua residuales utilizando la cáscara de la mandarina (citrus reticulata var. Clementina). Tesis (Ingeniero Ambiental) Cuenca- Ecuador: Universidad Politecnica Salesiana. 2017.

ZEGARRA Aliaga Rosa Inés. Obtención de zumo de membrillo (cydonia vulgaris) mediante el tratamiento enzimático con poligalacturonasa y biopectinasa LM. Tesis (ingeniero en industrias alimentarias) tingo maría - Perú: Universidad Nacional Agraria de la Selva. 2000.

ZHENG J., Choo K., Rehmann L., 2015. The effects of screw elements on enzymatic digestibility of corncobs after pretreatment in a twin-screw extruder. *Biomass and bioenergy*. 74, 224-232.

ANEXOS

Anexo 1. análisis de humedad en la cascarilla de arroz

EQUIPOS:

- Balanza analítica, sensible en 0.1 mg.
- Cápsulas de vidrio, porcelana o metálica, con tapa
- Desecador con deshidratante adecuado
- Estufa regulada a 105 ± 2 °C

PROCEDIMIENTO:

1. Colocar la cápsula destapada y la tapa durante al menos 1 hora en la estufa a la temperatura de secado del producto
2. Empleando las pinzas, trasladar la cápsula tapada al desecador y dejar enfriar durante 30 a 45 min. Pesar la cápsula con tapa con aproximación de 0.1 mg. Registrar (m1)
3. Pesar 5 g de muestra previamente homogenizada. Registrar (m2)
4. Colocar muestra con cápsula destapada en la estufa a la temperatura y tiempo recomendado 105 °C x 3 horas.
5. Tapar la cápsula con la muestra, sacarla de la estufa, enfriar en desecador durante 30 a 45 min.
6. Repetir el procedimiento de secado por una hora adicional, hasta que las variaciones entre dos pesadas sucesivas no excedan de 5 mg. (m3).

$$\% \text{Humedad} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100$$

Dónde,

M_1 = masa de la cápsula vacía y de su tapa, en gramos.

M_2 = masa de la cápsula tapada con la muestra antes del secado, en gramos.

M_3 = masa de la cápsula con tapa más la muestra desecada, en gramos.

Anexo 2. análisis de cenizas en la cascarilla de arroz

EQUIPOS:

- Balanza analítica, sensible en 0.1 mg.
- Crisoles de porcelana
- Mufla regulada a 550 +/- 25°C
- Desecador

PROCEDIMIENTO:

1. Colocar crisol limpio y seco por una hora en Mufla a 550 +/- 25°C.
2. Sacar y llevar desecador hasta enfriar.
3. Pesar crisol en balanza analítica y registrar su peso (C1).
4. Pesar entre 2 a 5 g de muestra previamente homogenizado (C2).
5. Precalentar previamente la muestra en mechero, evitando que inflame, luego colocar en la mufla a 550 +/- 25°C. hasta cenizas, preenfriar en mufla apagada.
6. Color crisol en desecador hasta enfriar (C3).

Porcentaje de ceniza se determina de la siguiente manera:

$$\%Ceniza = \frac{C3 - C1}{C2 - C1} \times 100$$

Dónde

C₁ = masa del crisol vacío en gramos.

C₂ = masa del crisol con las muestras en gramos.

C₃ = masa del crisol con las cenizas en gramos.

Anexo 3. análisis de microscopía electrónica de barrido (Verdugo J. 2017).

El cambio de la macroestructura de muestras con y sin- pretratamiento de la cascarilla de arroz observaron usando un microscopio electrónico de barrido; estas muestras deben ser liofilizadas durante 5 horas. Y a continuación, las muestras se colocan en las portas muestras del microscopio. Para la observación dentro del microscopio, las muestras deben contar con un recubrimiento de un material conductor, para ello se puede usar oro Sputter Coating Quorum o también carbón. Luego las muestras fueron insertadas en el microscopio electrónico de barrido Bruker – xfs 6/10. Se observaron las muestras con un voltaje de 10 kv y se obtuvieron varias fotografías con una magnificación de 500X y 1000X.

Anexo 4. determinación del pH en la cascarilla de arroz

EQUIPOS:

- pH neutro graduado.
- Soluciones buffer pH 4.00 y 7.00.
- Agua destilada

PROCEDIMIENTO:

1. Pesar 10 g de muestra (cascarilla de arroz).
2. Colocar los 10 g de muestra dentro un balón de ebullición de 250 ml.
3. Adicionar 100 ml de agua destilada y mezclar.
4. Montar el equipo de reflujo y someterlo a este proceso durante 3 h.
5. Al finalizar las 3 h. remover y tapar la solución dejando enfriar hasta 25 – 20 °C.
6. Medir el pH durante 3 min. Previamente ya calibrado el equipo.

Anexo 5. determinación de la holocelulosa (browning, 1967).

REACTIVOS:

- Ácido acético glacial (CH₃COOH).
- Clorito sódico (NaClO₂).

PROCEDIMIENTO:

Se pesan 2 g de muestra (P₁), con precisión de 0,0001 g, en un Erlenmeyer de 250 mL de capacidad y se añaden 63 mL de agua desionizada. A la suspensión se le añaden 0,2 mL de CH₃COOH y 0,6 g de NaClO₂. Se cubre con un vidrio de reloj y se introduce al baño maría (70-80 °C), agitando de vez en cuando. Este proceso se repite dos veces más. Al finalizar la tercera hora, se coloca el Erlenmeyer en un baño de agua-hielo hasta que la temperatura baje a los 10 °C. Se filtra en placa filtrante, previamente pesada (P₂) y se lava con agua desionizada hasta la eliminación de la coloración amarilla. Posteriormente se lava con agua desionizada, se deja secar a 60 °C y se pesa (P₃). Al sólido obtenido se le determinan los porcentajes de humedad (% H_{holo}) y de la materia orgánica (% MO_{holo}). El contenido de holocelulosa se calcula de acuerdo con la expresión:

$$\%Holocelulosa = \frac{(P_3 - P_2) * (100 - \%H_{holo}) * (\%MO_{holo})}{(P_1 * (100 - \%H))}$$

- P₁** : Peso Inicial De La Muestra
P₂ : Peso Del Papel Filtro
P₃ : Peso sólido después de las 12 h.
%MO_{holo} : Materia Orgánica
%H : Humedad Operativa

Dónde % H es el porcentaje de agua con respecto a muestra liofilizada y molida.

Anexo 6. determinación de celulosa: norma ansi/astm (american national standards institute, 1977).

REACTIVOS:

- Hidróxido sódico (NaOH) al 17,5% y 8,3%.
- Ácido acético glacial (CH₃COOH) al 10 %.

PROCEDIMIENTO:

Se pesa 1 g de holocelulosa (P₁), con precisión de 0,0001 g, en un Erlenmeyer de 100 mL. Se añaden 5 mL de NaOH 17,5% mezclando con una varilla de vidrio. Cada 5 minutos se añaden 2,5 mL de NaOH 17,5% hasta consumir un total de 12,5 mL y se mantiene 30 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 16,5 mL de agua desionizada a 20 °C para pasar de NaOH 17,5% a 8,3%, se mezcla bien y se mantiene durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se filtra en placa filtrante de peso conocido (P₂) y se lava con 50 mL de NaOH 8,3% y posteriormente con agua desionizada. Se repite el lavado con NaOH 8,3% y agua desionizada dos veces. Se corta la succión y se añaden 7,5 mL de CH₃COOH 10% y se deja en contacto 3 minutos. Se vuelve a conectar el vacío y se lava con agua desionizada hasta neutralidad del filtrado. Se seca a 105 °C en estufa durante 12 horas y se pesa (P₃). Se calcula el contenido en materia orgánica del sólido obtenido (% MO_{cel}), y el contenido en celulosa se calcula de acuerdo con la expresión:

$$\%Celulosa = \frac{(P_3 - P_2) * (\%MO_{cel}) * (\%Holocelulosa) * 100}{(P_1 (\%MO_{holo} * (100 - \%H_{holo}))}$$

- P₁** : Peso Inicial De La Muestra
P₂ : Peso Del Papel Filtro
P₃ : Peso sólido después de las 12 h.
%MO_{cel} : Materia Orgánica
%H : Humedad Operativa

Dónde % H es el porcentaje de agua con respecto a muestra liofilizada y molida.

Anexo 7. determinación de lignina (lignina klason): método tappi 222 (1977).
REACTIVOS:

- Ácido sulfúrico al 72% (H₂SO₄).

PROCEDIMIENTO:

Se pesa 1 g de muestra (P₁), con precisión de 0,0001 g, se mezcla bien con 15 mL de H₂SO₄ 72% y se deja reposar 12-24 horas. Se trasvasa el contenido del vaso a un matraz de 1.000 mL y se añaden 345 mL de agua desionizada para pasar de H₂SO₄ 72% a H₂SO₄ 3%. El matraz se conecta a un refrigerante y se mantiene a ebullición durante 4 horas en una manta calefactora, al cabo de las cuales se deja sedimentar el sólido y se filtra en una placa filtrante, previamente secada en estufa a 105 °C y pesada (P₂).

El sólido filtrado se lava con abundante agua desionizada caliente hasta que el pH del agua de lavado no sea ácido, se seca en estufa a 105 °C durante 12 horas y se pesa (P₃). Se toman unos 100 mg del sólido seco y se calcinan en mufla a 430 °C durante 24 horas, obteniéndose así su porcentaje en materia orgánica (MO_{lig}). El contenido en lignina se calcula con la siguiente expresión:

$$\%Lignina = \frac{(P_3 - P_2) * (\%MO_{lig}) * 100}{(P_1 * (100 - \%H))}$$

P₁	: Peso Inicial De La Muestra
P₂	: Peso Del Papel Filtro
P₃	: Peso sólido después de las 12 h.
%MO_{lig}	: Materia Orgánica
%H	: Humedad Operativa

Dónde % H es el porcentaje de agua con respecto a muestra liofilizada y molida.

Anexo 8. determinación de azúcares reductores por la técnica de miller (dns) descrito por miller (1959).

❖ Preparación del reactivo del ácido 3,5 dinitrosalicílico en frío:

Se pesan 5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, 150 g de tartrato de Na-K y 8 g de NaOH. Se disuelve el NaOH en 200 mL de agua y se añade en agitación el tartrato de Na-K lentamente. Se completa con agua hasta 400 mL y se comienza a añadir lentamente el ácido 3,5 dinitrosalicílico. Se deja en agitación toda la noche, se enrasa a 500 mL y se filtra.

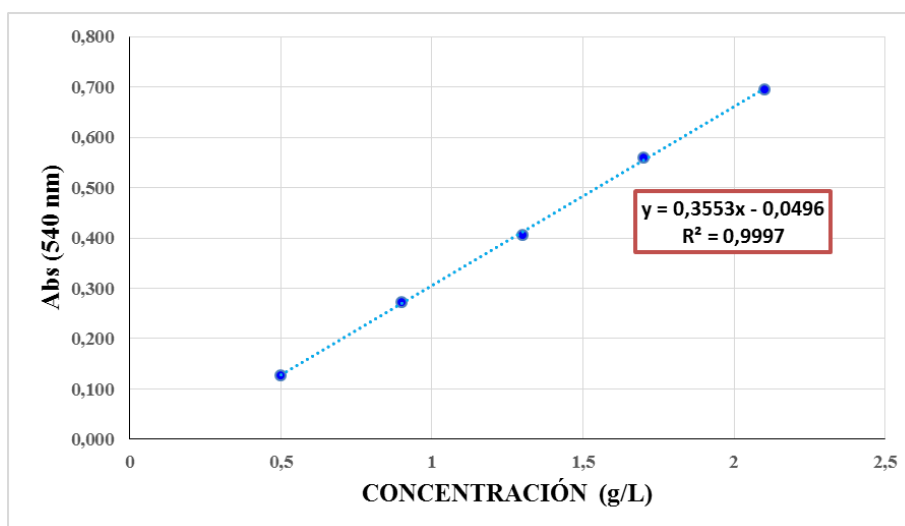
❖ Desarrollo de la reacción del DNS

En tubos de cristal de 10 mL se adicionan 0.1 mL de muestra y 0.9 mL del reactivo de DNS. Los tubos se colocan en baño de agua a 100 °C por 10 min. Se enfrían hasta temperatura ambiente y se le añade 10 mL de agua destilada. Se agita y se realiza la lectura a 540 nm en espectrofotómetro.

❖ Curva patrón de Glucosa

Se prepara la solución patrón de Glucosa a las siguientes concentraciones: 0.5, 0.9, 1.3, 1.7, 2.1 g/L. Se desarrolla la reacción con el reactivo DNS según el punto anterior.

ANEXO 9. CURVA PATRÓN DE GLUCOSA



Fuente: Elaboración propia

Figura 8. Curva de calibración de soluciones patrón de glucosa en el espectrofotómetro.

Anexo 10. detalles de los datos experimentales

Tabla 5. Determinación de la humedad de la cascarilla de arroz homogénea (C₀).

Ensayo	Placas vacías (g)	Muestra inicial (g)	Muestra + placas vacías (g) x3 h a 105°C	%Humedad
C ₀ R ₁	12,826	0,502	13,307	4,18
C ₀ R ₂	22,321	0,500	22,798	4,60
C ₀ R ₃	22,520	0,506	23,003	4,55
Promedio				4,44 %
Desviación estándar				0,0023

Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 6. Determinación de humedad de la cascarilla pretratadas (C₁, C₂ y C₃).

Ensayo	Placas vacías (g)	Muestra inicial (g)	Muestra + placas vacías (g)	Muestra + placas vacías x3 h a 105°C (g)	% Humedad	Promedio	Desviación Estándar
C ₁ R ₁	23,612	0,099	23,711	23,709	2,02		
C ₁ R ₂	22,682	0,103	22,785	22,783	1,94	1,98 %	0,00039
C ₁ R ₃	24,467	0,101	24,568	24,566	1,98		
C ₂ R ₁	23,16	0,101	23,261	23,259	1,98		
C ₂ R ₂	21,963	0,100	22,063	22,061	2,00	1,97 %	0,00040
C ₂ R ₃	23,368	0,104	23,472	23,47	1,92		
C ₃ R ₁	22,324	0,102	22,426	22,424	1,96		
C ₃ R ₂	22,718	0,100	22,818	22,816	2,00	1,99 %	0,00023
C ₃ R ₃	22,979	0,100	23,079	23,077	2,00		

Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 7. Determinación de ceniza de la cascarilla de arroz homogénea (C₀).

Ensayo	Crisol vacío (g)	Muestra (g)	Muestra + crisol (g) x5 h a 550°C	%Cenizas
C ₀ R ₁	29,522	1,001	29,666	14,33
C ₀ R ₂	47,948	1,000	48,087	13,90
C ₀ R ₃	31,703	1,001	31,845	14,20
Promedio				14,14 %
Desviación estándar				0,0022

Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 8. Determinación de pH de la cascarilla de arroz homogénea (C₀).

Ensayo	Muestra (ml)	pH	T (°C)
C ₀ R ₁	40	6,09	24
C ₀ R ₂	40	6,08	24
C ₀ R ₃	40	6,08	24,2
Promedio		6,08	24,1
Desviación estándar		0,0058	

Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 9. Determinación de la holocelulosa de la cascarilla de arroz.

Ensayos	P1 (g)	P2 (g)	% H. Holo	% M.O. Holo	% Holocelulosa	Promedio	Desviación estándar
C ₀ R ₁	2	1,527	1,942	83,478	65,227		
C ₀ R ₂	2	1,523	2,000	83,480	65,302	65,56	0,5089
C ₀ R ₃	2	1,542	1,905	83,480	66,144		
C ₁ R ₁	2	1,566	1,922	84,637	66,337		
C ₁ R ₂	2	1,588	1,905	84,633	67,224	66,99	0,5730
C ₁ R ₃	2	1,592	1,923	84,635	67,409		
C ₂ R ₁	2	1,546	1,980	99,043	76,561		
C ₂ R ₂	2	1,549	1,961	99,051	76,745	76,72	0,1494
C ₂ R ₃	2	1,552	1,942	99,060	76,856		
C ₃ R ₁	2	1,515	1,887	98,930	74,996		
C ₃ R ₂	2	1,509	1,980	98,937	74,663	74,95	0,2667
C ₃ R ₃	2	1,520	2,000	98,935	75,191		

Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 10. Determinación de la celulosa de la cascarilla de arroz.

Ensayos	P1 (g)	P2 (g)	% M.O. Cel.	% H. Holo	% M.O. holo	% Holocelulosa	% Celulosa	Promedio	Desviación estándar
C ₀ R ₁	1	0,533	87,600	1,942	83,478	65,227	37,205		
C ₀ R ₂	1	0,527	87,888	2,000	83,480	65,302	36,950	37,28	0,3729
C ₀ R ₃	1	0,532	87,649	1,905	83,480	66,144	37,684		
C ₁ R ₁	1	0,623	88,579	1,922	84,637	66,337	44,079		
C ₁ R ₂	1	0,629	88,321	1,905	84,633	67,224	44,991	44,44	0,4868
C ₁ R ₃	1	0,617	88,304	1,923	84,635	67,409	44,238		
C ₂ R ₁	1	0,784	95,655	1,980	99,043	76,561	59,141		
C ₂ R ₂	1	0,770	95,192	1,961	99,051	76,745	57,958	58,69	0,6367
C ₂ R ₃	1	0,783	95,202	1,942	99,060	76,856	58,957		
C ₃ R ₁	1	0,847	95,481	1,887	98,930	74,996	62,471		
C ₃ R ₂	1	0,850	95,470	1,980	98,937	74,663	62,484	62,51	0,0609
C ₃ R ₃	1	0,845	95,467	2,000	98,935	75,191	62,583		

Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 11. Determinación de la hemicelulosa de la cascarilla de arroz.

Ensayos	% Holocelulosa	% Celulosa	% Hemicelulosa	Promedio	Desviación estándar
C ₀ R ₁	65,227	37,205	28,022		
C ₀ R ₂	65,302	36,950	28,352	28,28	0,2279
C ₀ R ₃	66,144	37,684	28,459		
C ₁ R ₁	66,337	44,079	22,258		
C ₁ R ₂	67,224	44,991	22,234	22,55	0,5342
C ₁ R ₃	67,409	44,238	23,171		
C ₂ R ₁	76,561	59,141	17,419		
C ₂ R ₂	76,745	57,958	18,788	18,04	0,6942
C ₂ R ₃	76,856	58,957	17,899		
C ₃ R ₁	74,996	62,471	12,525		
C ₃ R ₂	74,663	62,484	12,179	12,44	0,2277
C ₃ R ₃	75,191	62,583	12,608		

Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 12. Determinación de la lignina de la cascarilla de arroz.

Ensayos	P1 (g)	P2 (g)	% M.O. Lig.	% Lignina	Promedio	Desviación estándar
C ₀ R ₁	1	0,166	85,363	14,753		
C ₀ R ₂	1	0,162	85,327	14,525	14,69	0,147
C ₀ R ₃	1	0,165	85,561	14,799		
C ₁ R ₁	1	0,184	85,997	16,132		
C ₁ R ₂	1	0,189	85,973	16,527	16,29	0,207
C ₁ R ₃	1	0,185	85,760	16,221		
C ₂ R ₁	1	0,206	96,960	20,358		
C ₂ R ₂	1	0,233	96,954	23,002	21,29	1,487
C ₂ R ₃	1	0,207	96,946	20,501		
C ₃ R ₁	1	0,248	97,147	24,574		
C ₃ R ₂	1	0,249	97,191	24,694	24,72	0,159
C ₃ R ₃	1	0,251	97,175	24,889		

Fuente: *Elaboración Propia.*

Tabla 13. Determinación del ancho de la cascarilla de arroz con los diferentes pretratamientos a partir de las micrografías.

Ensayos	Perímetro	Promedio	Desviación estándar
C ₀ R ₁	0,15		
C ₀ R ₂	0,153	0,153	0,003
C ₀ R ₃	0,156		
C ₁ R ₁	0,146		
C ₁ R ₂	0,147	0,148	0,0021
C ₁ R ₃	0,15		
C ₂ R ₁	0,135		
C ₂ R ₂	0,136	0,137	0,0026
C ₂ R ₃	0,14		
C ₃ R ₁	0,09		
C ₃ R ₂	0,084	0,085	0,005
C ₃ R ₃	0,08		

Fuente: *Elaboración Propia.*

Tabla 14. Determinación de glucosa (g/L) cada 12 horas de hidrolizado.

TIEMPO (h)	ENSAYOS	DILUCIÓN	CONCENTRACIÓN ESPECTRO	ABSORBANCIA (540 nm)	CONCENTRACIÓN REAL (g/L)	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
0	C ₀ R ₁	12,00 0	0,018	0,811	0,218	0,331	0,119
	C ₀ R ₂	12,00 0	0,027	0,814	0,319		
	C ₀ R ₃	12,00 0	0,038	0,818	0,455		
0	C ₁ R ₁	12,00 0	0,570	1,007	6,838	6,545	0,256
	C ₁ R ₂	12,00 0	0,530	0,993	6,365		
	C ₁ R ₃	12,00 0	0,536	0,995	6,433		
0	C ₂ R ₁	12,00 0	1,079	1,188	12,951	12,388	0,528
	C ₂ R ₂	12,00 0	0,992	1,157	11,904		
	C ₂ R ₃	12,00 0	1,026	1,169	12,309		
0	C ₃ R ₁	12,00 0	2,698	1,763	32,371	34,274	1,739
	C ₃ R ₂	12,00 0	2,889	1,831	34,668		
	C ₃ R ₃	12,00 0	2,982	1,864	35,782		
12	C ₀ R ₁	12,00 0	1,397	1,301	16,768	17,387	1,191
	C ₀ R ₂	12,00 0	1,563	1,360	18,760		
	C ₀ R ₃	12,00 0	1,386	1,297	16,632		
12	C ₁ R ₁	12,00 0	2,858	1,820	34,296	33,846	0,403
	C ₁ R ₂	12,00 0	2,793	1,797	33,520		
	C ₁ R ₃	12,00 0	2,810	1,803	33,722		
12	C ₂ R ₁	12,00 0	3,103	1,907	37,235	40,455	2,847
	C ₂ R ₂	12,00 0	3,458	2,033	41,490		

	C₂ R₃	12,00 0	3,553	2,067	42,639		
	C₃ R₁	12,00 0	3,852	2,173	46,219		
12	C₃ R₂	12,00 0	3,745	2,135	44,935	45,329	0,772
	C₃ R₃	12,00 0	3,736	2,132	44,834		

Tabla 14. Continua

	C₀ R₁	12,000	2,233	1,598	26,798		
24	C₀ R₂	12,000	2,092	1,548	25,110	26,022	0,852
	C₀ R₃	12,000	2,180	1,579	26,157		
	C₁ R₁	12,000	3,306	1,979	39,666		
24	C₁ R₂	12,000	3,351	1,995	40,207	39,824	0,333
	C₁ R₃	12,000	3,300	1,977	39,599		
	C₂ R₁	12,000	3,767	2,143	45,205		
24	C₂ R₂	12,000	3,581	2,077	42,976	44,733	1,574
	C₂ R₃	12,000	3,835	2,167	46,016		
	C₃ R₁	12,000	4,336	2,345	52,028		
24	C₃ R₂	12,000	4,277	2,324	51,319	51,668	0,355
	C₃ R₃	12,000	4,305	2,334	51,656		
	C₀ R₁	12,000	2,695	1,762	32,337		
36	C₀ R₂	12,000	2,703	1,765	32,439	31,977	0,714
	C₀ R₃	12,000	2,596	1,727	31,155		
	C₁ R₁	12,000	3,514	2,053	42,166		
36	C₁ R₂	12,000	3,564	2,071	42,774	42,233	0,510
	C₁ R₃	12,000	3,480	2,041	41,760		
	C₂ R₁	12,000	4,330	2,343	51,960		
36	C₂ R₂	12,000	3,860	2,176	46,320	49,337	2,841
	C₂ R₃	12,000	4,144	2,277	49,731		
	C₃ R₁	12,000	5,104	2,618	61,248		
36	C₃ R₂	12,000	5,338	2,701	64,052	62,093	1,702
	C₃ R₃	12,000	5,082	2,610	60,978		
48	C₀ R₁	12,000	2,596	1,727	31,155	33,002	1,808

	C₀ R₂	12,000	2,897	1,834	34,769		
	C₀ R₃	12,000	2,757	1,784	33,081		
48	C₁ R₁	12,000	3,722	2,127	44,665		
	C₁ R₂	12,000	3,928	2,200	47,131	45,408	1,496
	C₁ R₃	12,000	3,702	2,120	44,429		
48	C₂ R₁	12,000	5,014	2,586	60,167		
	C₂ R₂	12,000	4,851	2,528	58,209	59,458	1,086
	C₂ R₃	12,000	5,000	2,581	59,999		
48	C₃ R₁	12,000	5,329	2,698	63,950		
	C₃ R₂	12,000	5,743	2,845	68,915	65,560	2,906
	C₃ R₃	12,000	5,318	2,694	63,815		

Tabla 14. Continua

60	C₀ R₁	12,000	2,999	1,870	35,985		
	C₀ R₂	12,000	2,973	1,861	35,681	35,895	0,186
	C₀ R₃	12,000	3,002	1,871	36,019		
60	C₁ R₁	12,000	3,863	2,177	46,354		
	C₁ R₂	12,000	3,610	2,087	43,314	45,757	2,206
	C₁ R₃	12,000	3,967	2,214	47,603		
60	C₂ R₁	12,000	4,783	2,504	57,398		
	C₂ R₂	12,000	5,321	2,695	63,849	61,214	3,384
	C₂ R₃	12,000	5,200	2,652	62,397		
60	C₃ R₁	12,000	5,965	2,924	71,583		
	C₃ R₂	12,000	5,695	2,828	68,341	67,384	4,751
	C₃ R₃	12,000	5,186	2,647	62,228		

Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 15. Determinación de la conversión de celulosa a glucosa.

Pretratamientos	% Celulosa (Y_i)	Masa inicial (g)	glucosa (g ART/ g S)	Fh (Factor conversión)	C de (Conversión de celulosa) (%)
C₀	37,280	1,000	0,359	0,9	86,657%
C₁	44,436	1,000	0,458	0,9	92,676%
C₂	58,685	1,000	0,612	0,9	93,879%
C₃	62,513	1,000	0,674	0,9	97,013%

Fuente: Elaboración Propia.

Anexo 11. fotografías del trabajo experimental



Fuente: Elaboración propia
Figura 8 Cascarilla de arroz seca.



Fuente: Elaboración propia
Figura 9. Selección de la cascarilla de arroz seca.



Fuente: Elaboración propia
Figura 11 Molienda de la cascarilla de arroz.



Fuente: Elaboración propia
Figura 10 Tamizado de la cascarilla de arroz.



Fuente: Elaboración propia
Figura 13 Determinación de humedad de las muestras.



Fuente: Elaboración propia
Figura 12 Determinación de cenizas de las muestras.



Fuente: Elaboración propia
 Figura 14 Tratamiento Químico de
 alcalinidad.

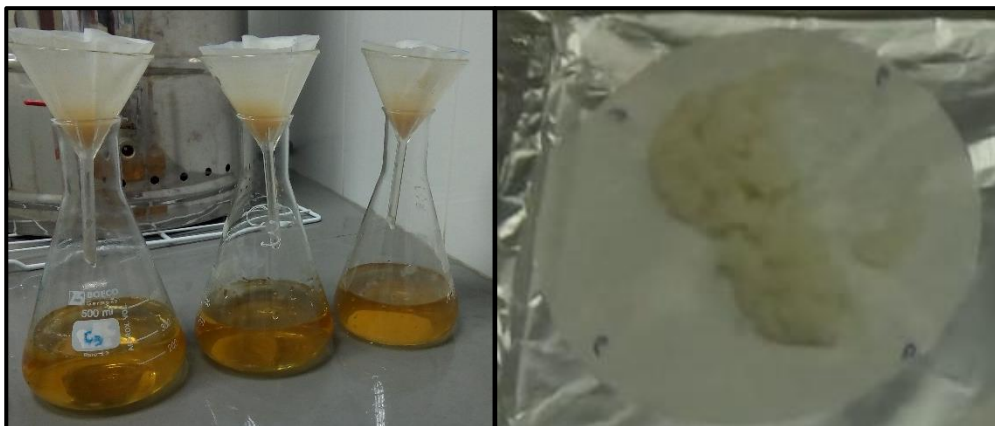


Fuente: Elaboración propia
 Figura 15 Tratamiento Físico de
 Congelación.



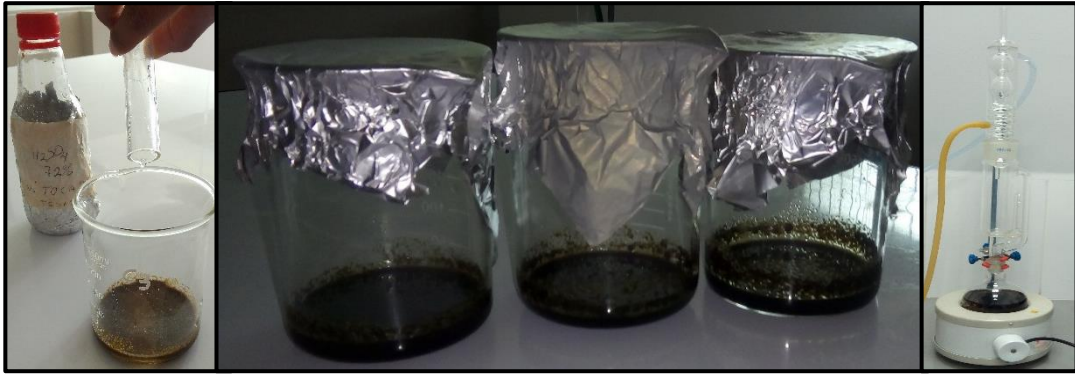
Fuente: Elaboración propia

Figura 16. Determinación de holocelulosa de la cascarilla pretratada y sin pretratar.



Fuente: Elaboración propia

Figura 17 Determinación de celulosa de la cascarilla pretratada y sin pretratar.



Fuente: Elaboración propia

Figura 18 Determinación de lignina de la cascarilla pretratada y sin pretratar.



Fuente: Elaboración propia

Figura 19 Determinación de pH de las muestras.



Fuente: Elaboración propia

Figura 20 Preparación del DNS.



Fuente: Elaboración propia

Figura 21 Muestras para la curva de calibración de glucosa.



Fuente: Elaboración propia
Figura 22 Hidrolisis enzimática.



Fuente: Elaboración propia
Figura 23. Muestras del hidrolisis enzimático cada 12 horas.

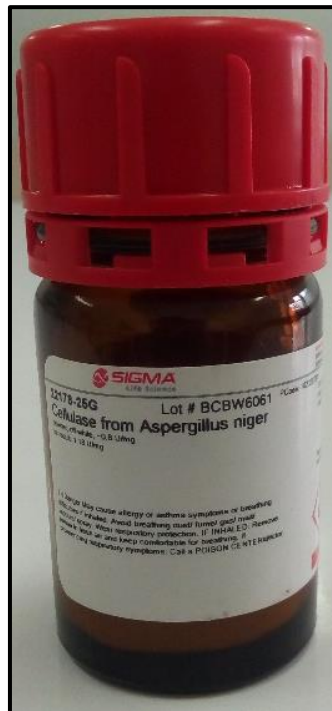


Fuente: Elaboración propia
Figura 24 Centrifugación de las muestras.



Fuente: Elaboración propia

Figura 25. Determinación de glucosa por espectrofotometría.



Fuente: Elaboración propia

Figura 26 Enzima Celulasa de Asperguillus niger.

Anexo 12. análisis estadístico

Tabla 16. Análisis de varianza de los componentes lignocelulósicos de la cascarilla de arroz.

Variables	Fuente	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	P
% CELULOSA	Entre grupos	1054.100	10	105.410	0.489	0.817
	Dentro de grupos	215.489	1	215.489		
	Total	1269.588	11			
% HEMICELULOSA	Entre grupos	365.963	10	36.596	0.859	0.694
	Dentro de grupos	42.596	1	42.596		
	Total	408.559	11	408.559		
% LIGNINA	Entre grupos	161.176	10	16.118	0.474	0.823
	Dentro de grupos	34.031	1	34.031		

Fuente: Elaboración Propia.

El ANOVA unifactorial indica que no hay diferencias en las variables % celulosa, % hemicelulosa y % lignina, de acuerdo con los tratamientos usados ($p < 0.05$).

Tabla 17. Análisis de variancia del ancho de la cascarilla de arroz con los diferentes pretratamientos.

Fuente	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	P
Entre grupos	3.000	0.009	0.003	257.856	0.000
Dentro de grupos	8.000	0.000	0.000		
Total	11.000	0.009			

Fuente: Elaboración Propia.

El ANOVA unifactorial indica que hay diferencias en el ancho de la cascarilla de arroz después, de acuerdo con los tratamientos usados (F: 257,856; $p < 0.000$)

Tabla 18. Prueba de Tukey para la anchura de la cascarilla de arroz.

ANCHURA DE LA CASCARILLA DE ARROZ					
	PRETRATAMIENTO S	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
HSD Tukey ^a	CONGELACIÓN + ALCALINO	3	,0847		
	ALCALINO	3		,1370	
	CONGELACIÓN	3			,1477
	CONTROL	3			,1530
	Sig.		1,000	1,000	,288

Fuente: Elaboración Propia.

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Tabla 19. Prueba de homogeneidad de varianza de la concentración de glucosa.

Estadístico de Levene	df1	df2	P
0.091	11	60	1.000

Fuente: Elaboración Propia.

La prueba de homogeneidad de varianza de Levene indica que se cumple el supuesto (Estadístico: 0,091; df1: 11 y df2: 60; $p > 0.05$).

Tabla 20. Análisis de variancia de la concentración de glucosa.

Variable	Fuente	Grados de Libertad	Suma de cuadrado s	Media cuadrática	F	P
Concentración de glucosa	Entre grupos	8604.952	11	782.268	3.48 1	0.00 1
	Dentro de grupos	13481.98 6	60	224.700		
	Total	22086.93 8	71			

Fuente: Elaboración Propia.

El ANOVA unifactorial indica que hay diferencias en la concentración de glucosa después, de acuerdo con los tratamientos usados (F: 3.481; $p < 0.001$).

Tabla 21. Prueba de Tukey para la concentración de glucosa.

CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA

	Pretratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
HSD Tukey ^a	CONTROLR1	6	24,43983	A
	CONTROLR3	6	25,04233	A
	CONTROLR2	6	25,07600	A
	CONGELACIÓNR2	6	35,55183	35,55183
	CONGELACIÓNR3	6	35,59100	35,59100
	CONGELACIÓN R1	6	35,66417	35,66417
	ALCALINOR2	6	44,12467	44,12467
	ALCALINOR1	6	44,15267	44,15267
	ALCALINOR3	6	45,51517	45,51517
	CONGE+ALCAR3	6	53,21550	53,21550
	CONGE+ALCAR1	6	B	54,56650
	CONGE+ALCAR2	6	B	55,37167
	Sig.			,061

Fuente: Elaboración Propia.

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

De acuerdo con la prueba post-hoc de tukey, se observa que las diferencias significativas se encuentran entre los grupos (Control R1 y Congelación + alcalinidad R1); (Control R1 y Congelación + alcalinidad R2); (Control R2 y Congelación + alcalinidad R2); (Control R3 y Congelación + alcalinidad R1); (Control R3 y Congelación + alcalinidad R2) ($p < 0.05$).

Tabla 22. Prueba de homogeneidad de varianza del rendimiento de Azúcares Reductores Totales

Estadístico de Levene	df1	df2	P
0.57	3	20	0.981

Fuente: Elaboración Propia.

La prueba de homogeneidad de varianza de Levene indica que se cumple el supuesto (Estadístico: 0,570; df1: 3 y df2: 20; $p > 0.05$).

Tabla 23. Análisis de variancia del rendimiento de Azúcares Reductores Totales.

Fuente	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	P
Entre grupos	3	286052.43	95350.81	4.304	0.017
Dentro de grupos	20	443089.280	22154.460		
Total	23	729141.71			

Fuente: Elaboración Propia.

El ANOVA unifactorial indica que hay diferencias en la concentración de glucosa después, de acuerdo con los tratamientos usados (F: 4.304; $p < 0.017$)

Tabla 24. Prueba de Tukey para el rendimiento de Azúcares Reductores Totales.

Rendimiento de ART - Tukey Ba

Pretratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Sin Pretratamiento	6	248,5283	A
Congelación	6	356,0217	356,0217
Alcalinidad	6	445,9750	445,9750
Congelación +Alcalinidad	6	B	543,8467

Fuente: Elaboración Propia.

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

De acuerdo con la prueba post-hoc de tukey, se observa que las diferencias significativas se encuentran entre los grupos (Sin pretratamiento y Congelación + alcalinidad) ($p < 0.05$).