

**Escuela Superior Politécnica del Litoral**

**Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas**

Producción de bioetanol a partir de lodos papeleros mediante el uso de celulasa  
de origen fúngico

INGE-2887

**Proyecto Integrador**

Previo la obtención del Título de:

**Ingeniero Químico**

Presentado por:

Ivonne Anahí Bravo Sánchez

Liu Bill Veliz Morán

Guayaquil - Ecuador

Año: 2025

## Dedicatoria

---

Dedico este proyecto con todo mi corazón a mis padres, Dídimo y Margarita, quienes han sido mi pilar y mi guía en cada paso de este camino. A mi querida ñaña, Cinthya, por ser mi inspiración y ejemplo a seguir, gracias por desafiarme siempre a dar lo mejor de mí y demostrarme que todo es posible.

A mi enamorado, Gustavo, por tu cariño, tu apoyo incondicional y tu paciencia; gracias por no soltar mi mano y recordarme en cada momento todo lo que puedo lograr si creo en mí.

Y a mis amigos, cuyo apoyo y cariño hicieron que este camino fuera más llevadero, recordándome siempre la importancia de compartir alegrías y superar juntos las dificultades.

**Ivonne Anahí Bravo Sánchez**

## Dedicatoria

---

Dedico este trabajo a mis padres, en especial a mi madre, por su amor y apoyo incondicional a lo largo de este camino. A mis hermanos, por estar siempre dispuestos a ayudarme, y a mis mascotas, fieles compañeras durante las largas noches de estudio.

A mis amigos de los últimos semestres, quienes hicieron que cada día en la universidad fuera más llevadero y memorable, aportando con su presencia a que este logro fuera posible.

Y, por último, me dedico esta meta a mí mismo, por no rendirme jamás, por mantenerme en pie incluso cuando las circunstancias parecían adversas, y por seguir luchando con determinación para alcanzar mis sueños.

**Liu Bill Veliz Morán**

## Agradecimientos

---

En primer lugar, agradezco profundamente a Dios y a mi querida Mater, por ser mi guía espiritual, sostenerme en los momentos de dificultad y recordarme siempre que con fe, entrega y confianza todo reto se vuelve posible.

A nuestra tutora, MSc. Lorena Quinchuela, por su apoyo incondicional, por su compromiso con nuestra formación y por inculcarnos el amor por la investigación, motivándonos siempre a dar lo mejor de nosotros mismos.

A todo el equipo de LABECO, por abrirnos las puertas para llevar a cabo nuestras experimentaciones, por su constante apoyo y, sobre todo, por convertirse en compañeros y amigos a lo largo de este proceso.

**Ivonne Anahí Bravo Sánchez**

## Agradecimientos

---

Agradezco primeramente a Dios y a mi Madre del Cielo, por haberme guiado y protegido en cada paso de este camino. Su presencia ha sido una fuente constante de fortaleza desde el inicio de esta travesía.

Agradezco profundamente a nuestra tutora, MSc. Lorena Quinchuela, por su compromiso, orientación y paciencia durante el desarrollo de este proyecto.

Al equipo del laboratorio LABECO, por abrirnos las puertas de sus instalaciones y permitirnos llevar a cabo nuestro trabajo de tesis con el respaldo técnico necesario.

A mis profesores, quienes también contribuyeron facilitando el uso de equipos y reactivos esenciales para la ejecución de este estudio.

A todos los que, de una u otra forma, creyeron en mí y me impulsaron a llegar hasta aquí. Gracias.

**Liu Bill Veliz Morn**

## Declaración Expresa

---

Nosotros Ivonne Anahí Bravo Sánchez y Liu Bill Veliz Morán acordamos y reconocemos que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique los autores que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 30 de Mayo de 2025.



---

Ivonne Anahí Bravo  
Sánchez



---

Liu Bill Veliz Morán

## **Evaluadores**

---

**María Verónica Ordóñez Pazmiño**

Profesor de Materia

---

**Lorena Jacqueline Quinchuela**

**Carrera**

Tutor de proyecto

## Resumen

El presente trabajo aborda la valorización de lodos papeleros como materia prima para la producción de bioetanol, con el objetivo de evaluar su potencial energético y proponer una alternativa sostenible frente a la disposición convencional de residuos. La investigación se justifica en la necesidad de reducir el impacto ambiental de la industria papelera y aprovechar subproductos lignocelulósicos con alta carga orgánica.

El estudio se desarrolló mediante la caracterización físico-química de lodos líquidos y húmedos, considerando parámetros iniciales como humedad, sólidos totales, pH y contenido de carbohidratos. Posteriormente se realizaron pretratamientos químicos, hidrólisis enzimática para liberar azúcares reductores, y fermentación alcohólica bajo un diseño compuesto central con dos variables de operación: temperatura (23–37 °C) y tiempo de incubación (14–82 h). Para la verificación del producto se emplearon técnicas de densidad, espectroscopía FTIR e índice de refracción.

Los resultados mostraron que el lodo húmedo, con mayor fracción de sólidos (24,19 %), alcanzó la concentración máxima de 74.29 g/L de etanol, superando al lodo líquido (65.57 g/L con 1.44 % de sólidos). Esta diferencia se explicó por la mayor disponibilidad de carbohidratos (3.85 g/L frente a 3.32 g/L) y la mayor eficiencia de conversión observada en el lodo húmedo. Asimismo, el análisis FTIR confirmó la presencia de etanol junto con subproductos secundarios (ácido acético y acetaldehído), que incidieron en la pureza del destilado.

La evaluación económica preliminar indicó que el costo unitario de producción en condiciones de laboratorio fue elevado (3676 USD/L) debido al bajo volumen de bioetanol obtenido; sin embargo, la proyección a escala mayor redujo este valor a 11.36 USD/L, lo que evidencia el potencial del proceso bajo condiciones de optimización y escalamiento.

**Palabras clave:** residuos industriales, fermentación alcohólica, bioenergía, sostenibilidad.

## Abstract

This study addresses the valorization of paper sludge as a raw material for bioethanol production, with the aim of evaluating its energy potential and proposing a sustainable alternative to conventional waste disposal. The research is justified by the need to reduce the environmental impact of the paper industry and to take advantage of lignocellulosic by-products with high organic content.

The study was carried out through the physical-chemical characterization of liquid and wet sludge, considering initial parameters such as moisture, total solids, pH, and carbohydrate content. Subsequently, chemical pretreatments, enzymatic hydrolysis to release reducing sugars, and alcoholic fermentation were carried out under a central composite design with two operating variables: temperature (23–37 °C) and incubation time (14–82 h). Density, FTIR spectroscopy, and refractive index techniques were used to verify the product.

The results showed that wet sludge, with a higher solids fraction (24.19%), reached a maximum concentration of 74.29 g/L of ethanol, surpassing liquid sludge (65.57 g/L with 1.44% solids). This difference was explained by the greater availability of carbohydrates (3.85 g/L versus 3.32 g/L) and the higher conversion efficiency observed in wet sludge.

Likewise, FTIR analysis confirmed the presence of ethanol along with secondary by-products (acetic acid and acetaldehyde), which affected the purity of the distillate.

The preliminary economic evaluation indicated that the unit cost of production under laboratory conditions was high (USD 3676/L) due to the low volume of bioethanol obtained; however, the larger-scale projection reduced this value to USD 11.36/L, demonstrating the potential of the process under optimization and scaling conditions.

**Keywords:** industrial waste, alcoholic fermentation, bioenergy, sustainability.

## Índice General

|                                                                             |      |
|-----------------------------------------------------------------------------|------|
| Evaluadores.....                                                            | vii  |
| Resumen.....                                                                | viii |
| Abstract.....                                                               | ix   |
| Índice General.....                                                         | x    |
| Abreviaturas.....                                                           | xiv  |
| Simbología.....                                                             | xv   |
| Índice de Figuras.....                                                      | xvi  |
| Índice de Tablas.....                                                       | xvii |
| Capítulo 1.....                                                             | 1    |
| 1.1. Introducción.....                                                      | 2    |
| 1.2. Descripción del Problema.....                                          | 3    |
| 1.3. Justificación del Problema.....                                        | 5    |
| 1.4. Objetivos.....                                                         | 6    |
| 1.4.1. Objetivo general.....                                                | 6    |
| 1.4.2. Objetivos específicos.....                                           | 7    |
| 1.5. Marco teórico.....                                                     | 7    |
| 1.5.1. Producción de bioetanol como alternativa energética.....             | 7    |
| 1.5.2. Biomasa lignocelulósica como materia prima para biocombustibles..... | 9    |
| 1.5.3. Hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos.....              | 10   |
| 1.5.4. Variables críticas en la optimización del proceso.....               | 11   |
| Capítulo 2.....                                                             | 14   |
| 2. Metodología.....                                                         | 15   |
| 2.1. Tipo de investigación y enfoque metodológico.....                      | 15   |
| 2.2. Caracterización del residuo lignocelulósico.....                       | 15   |
| 2.2.1. Origen y recolección del lodo papelerero.....                        | 15   |
| 2.2.2. Proceso experimental para la obtención de muestras.....              | 16   |

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.3. Parámetros físico-químicos evaluados (humedad, pH, sólidos totales)..... | 16 |
| 2.3. Pretratamiento del lodo .....                                              | 17 |
| 2.3.1. Pretratamiento alcalino con NaOH .....                                   | 18 |
| 2.3.2. Secado y filtración .....                                                | 18 |
| 2.3.3. Pretratamiento ácido con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....            | 18 |
| 2.3.4. Secado final y conservación del sólido .....                             | 19 |
| 2.4. Hidrólisis enzimática .....                                                | 19 |
| 2.4.1. Condiciones de incubación y preparación del inóculo enzimático .....     | 19 |
| 2.4.2. Conservación de muestras para DNS .....                                  | 20 |
| 2.4.3. Verificación de la actividad enzimática .....                            | 21 |
| 2.4.4. Cuantificación de azúcares reductores (DNS) .....                        | 22 |
| 2.5. Diseño experimental .....                                                  | 22 |
| 2.5.1. Selección de variables: Temperatura y tiempo de incubación .....         | 22 |
| 2.5.2. Justificación del diseño FCCCD .....                                     | 23 |
| 2.5.3. Matriz experimental de 16 ensayos .....                                  | 23 |
| 2.6. Fermentación alcohólica .....                                              | 24 |
| 2.6.1. Condiciones anaeróbicas y parámetros controlados .....                   | 24 |
| 2.6.2. Procedimiento experimental por ensayo .....                              | 24 |
| 2.6.3. Activación de levaduras y preparación del inóculo .....                  | 25 |
| 2.7. Destilación y cuantificación de etanol .....                               | 25 |
| Capítulo 3.....                                                                 | 26 |
| 3. Resultados y análisis .....                                                  | 27 |
| 3.1. Caracterización del lodo paplero .....                                     | 27 |
| 3.1.1. Humedad, sólidos totales y pH .....                                      | 27 |
| 3.1.2. Interpretación de la caracterización .....                               | 27 |
| 3.2. Pretratamiento del lodo paplero .....                                      | 28 |
| 3.2.1. Resultados del pretratamiento alcalino y ácido .....                     | 28 |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.2. Cambios en parámetros físico-químicos .....                         | 29 |
| 3.2.3. Rendimiento y análisis comparativo .....                            | 30 |
| 3.3. Hidrólisis enzimática .....                                           | 30 |
| 3.3.1. Verificación de la actividad enzimática .....                       | 30 |
| 3.3.2. Liberación de carbohidratos y azúcares reductores .....             | 31 |
| 3.3.3. Resultados comparativos entre lodo líquido y húmedo .....           | 32 |
| 3.4. Fermentación alcohólica .....                                         | 32 |
| 3.4.1. Producción de etanol por tratamiento y condición experimental.....  | 32 |
| 3.4.2. Producción de etanol en lodo húmedo y líquido (FCCCD).....          | 19 |
| 3.4.3. Análisis estadístico RSM y modelos de superficie de respuesta ..... | 19 |
| 3.4.4. Interpretación de condiciones óptimas.....                          | 22 |
| 3.5. Verificación del etanol obtenido.....                                 | 23 |
| 3.5.1. Determinación de densidad del destilado .....                       | 23 |
| 3.5.2. Curva de calibración de etanol.....                                 | 24 |
| 3.5.3. Análisis FTIR del destilado .....                                   | 24 |
| 3.6. Evaluación económica preliminar del proceso .....                     | 26 |
| 3.6.1. Consumo de reactivos .....                                          | 26 |
| 3.6.2. Consumo energético.....                                             | 27 |
| 3.6.3. Estimación de costos de laboratorio .....                           | 28 |
| 3.6.4. Proyección de costos a escala mayor .....                           | 28 |
| 3.7. Discusión general de resultados.....                                  | 29 |
| 3.7.1. Relación entre condiciones iniciales y rendimiento de etanol .....  | 29 |
| 3.7.2. Comparación con estudios previos .....                              | 30 |
| Capítulo 4.....                                                            | 32 |
| 4. Conclusiones y Recomendaciones.....                                     | 33 |
| 4.1. Conclusiones.....                                                     | 33 |
| 4.2. Recomendaciones .....                                                 | 35 |

|                    |    |
|--------------------|----|
| Bibliografia ..... | 36 |
| Apéndice A .....   | 40 |
| Apéndice B.....    | 45 |

## Abreviaturas

|       |                                                                                                 |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ANOVA | Análisis de Varianza                                                                            |
| ASTM  | American Society for Testing and Materials                                                      |
| DOE   | Diseño de Experimentos (Design of Experiments)                                                  |
| FCCCD | Diseño Compuesto Central con Factores (Face-Centered Central Composite Design)                  |
| FTIR  | Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) |
| FPU   | Filter Paper Unit                                                                               |
| IR    | Índice de Refracción                                                                            |
| LCA   | Análisis de Ciclo de Vida (Life Cycle Assessment)                                               |
| RSM   | Metodología de Superficie de Respuesta (Response Surface Methodology)                           |
| U     | Unidad Enzimática                                                                               |

## Simbología

|     |                                |
|-----|--------------------------------|
| C   | Carbono                        |
| cm  | Centímetro                     |
| g   | Gramo                          |
| g/L | Gramos por litro               |
| h   | Hora                           |
| IR  | Índice de Refracción           |
| L   | Litro                          |
| mL  | Mililitro                      |
| mg  | Miligramo                      |
| pH  | Potencial de Hidrógeno         |
| R   | Rendimiento (g/L de etanol)    |
| T   | Temperatura (°C)               |
| t   | Tiempo de incubación (h)       |
| U/g | Unidades enzimáticas por gramo |
| %   | Porcentaje                     |
| °C  | Grados Celsius                 |

## Índice de Figuras

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. <i>Esquema general de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica</i>                             | 8  |
| Figura 2. <i>Esquema de hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica</i> .....                                          | 10 |
| Figura 3. <i>Diagrama de flujo del procesamiento de lodo líquido para la producción de bioetanol</i> .....                  | 18 |
| Figura 4. <i>Diagrama de flujo del procesamiento de lodo sólido para la producción de bioetanol</i><br>.....                | 19 |
| Figura 5. <i>Azúcares reductores en lodo líquido y húmedo (g/L)</i> .....                                                   | 29 |
| Figura 6. <i>Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para lodo húmedo</i> .....                                        | 20 |
| Figura 7. <i>Superficie de respuesta del rendimiento de etanol en función de temperatura y tiempo en lodo húmedo</i> .....  | 20 |
| Figura 8. <i>Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para lodo líquido</i> .....                                       | 21 |
| Figura 9. <i>Superficie de respuesta del rendimiento de etanol en función de temperatura y tiempo en lodo líquido</i> ..... | 22 |
| Figura 10. <i>Curva de calibración de etanol mediante índice de refracción</i> .....                                        | 24 |
| Figura 11. <i>Espectros FTIR del destilado (azul) y etanol estándar (rojo)</i> .....                                        | 25 |

## Índice de Tablas

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. <i>Clasificación del bioetanol según el tipo de materia prima utilizada</i> .....                    | 7  |
| Tabla 2. <i>Componentes estructurales de la biomasa lignocelulósica</i> .....                                 | 9  |
| Tabla 3. <i>Parámetros que afectan la eficiencia de la hidrólisis enzimática</i> .....                        | 11 |
| Tabla 4. <i>Comportamiento fermentativo de S. cerevisiae según temperatura</i> .....                          | 12 |
| Tabla 5. <i>Efecto del tiempo de incubación en fermentación alcohólica</i> .....                              | 13 |
| Tabla 6. <i>Parámetros del pretratamiento alcalino y ácido aplicado al lodo papelerero</i> .....              | 19 |
| Tabla 7. <i>Parámetros experimentales de la hidrólisis enzimática del lodo papelerero pretratado</i><br>..... | 20 |
| Tabla 8. <i>Matriz experimental basada en diseño FCCCD para la producción de bioetanol</i> ..                 | 23 |
| Tabla 9. <i>Parámetros físico-químicos iniciales del lodo papelerero</i> .....                                | 27 |
| Tabla 10. <i>Cuantificación de carbohidratos en lodo líquido y húmedo</i> .....                               | 30 |
| Tabla 11. <i>Resultados promedio de la determinación de la actividad enzimática</i> .....                     | 31 |
| Tabla 12. <i>Resultados de fermentación alcohólica en lodo líquido (FCCCD)</i> .....                          | 18 |
| Tabla 13. <i>Resultados de fermentación alcohólica en lodo húmedo (FCCCD)</i> .....                           | 18 |
| Tabla 14. <i>Determinación de densidad del destilado mediante picnómetro lodo húmedo y líquido</i> .....      | 23 |
| Tabla 15. <i>Consumo de reactivos – Lodo líquido</i> .....                                                    | 26 |
| Tabla 16. <i>Consumo de reactivos – Lodo húmedo</i> .....                                                     | 27 |
| Tabla 17. <i>Proyección de Costo de Producción a Escala Mayor</i> .....                                       | 29 |
| Tabla 18. <i>Valores de absorbancia y concentración para la curva de calibración de glucosa</i><br>.....      | 40 |
| Tabla 19. <i>Datos de la curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores</i> .             | 40 |
| Tabla 20. <i>Cuantificación de azúcares reductores en lodo líquido</i> .....                                  | 40 |
| Tabla 21. <i>Cuantificación de azúcares reductores en lodo húmedo</i> .....                                   | 41 |
| Tabla 22. <i>Resultados de la determinación de la actividad enzimática</i> .....                              | 41 |
| Tabla 23. <i>Datos de la curva de calibración de etanol</i> .....                                             | 42 |
| Tabla 24. <i>Consumo Energético - Lodo Líquido</i> .....                                                      | 42 |
| Tabla 25. <i>Consumo Energético - Lodo Húmedo</i> .....                                                       | 43 |
| Tabla 26. <i>Cálculo de Costo Total de Producción - Lodo Líquido y Lodo Humedo</i> .....                      | 43 |

## Capítulo 1

## 1.1. Introducción

La presión ambiental, el agotamiento de los recursos fósiles y la creciente demanda energética han impulsado la búsqueda de fuentes de energía alternativas, sostenibles y económicamente viables (Ayala, 2024). En este marco, producir bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica surge como una estrategia prometedora para convertir residuos orgánicos en biocombustibles y promover una economía circular.

En Ecuador, la situación no es ajena a estos desafíos. La matriz energética nacional, aunque sustentada en gran medida por energía hidroeléctrica, sigue dependiendo de derivados del petróleo para diversos sectores, especialmente el transporte y algunas aplicaciones industriales (Manzano Mantilla, 2023). La gestión de residuos industriales, especialmente en el sector papelerero, sigue siendo un desafío ambiental. Los lodos generados, compuestos en su mayoría por celulosa, hemicelulosa y en menor proporción lignina y cenizas, suelen desecharse en rellenos o compostarse, desaprovechando su potencial energético.

La industria papelería ecuatoriana, y en particular las plantas recicladoras de papel ubicadas en la ciudad de Guayaquil, producen lodos residuales como subproducto del tratamiento primario de aguas. Estos lodos, al no contener contaminantes tóxicos, resultan ideales para su aprovechamiento mediante biotecnologías limpias. No obstante, la ausencia de estudios experimentales sistemáticos sobre su valorización energética ha limitado su integración en cadenas de producción circulares.

Este proyecto propone soluciones técnicas para tratar lodos papeleros mediante un proceso biológico orientado a la producción de bioetanol. Se parte del supuesto de que la hidrólisis enzimática, seguida de la fermentación alcohólica controlada, permite liberar y transformar los azúcares estructurales de estos residuos en etanol, un biocombustible de creciente interés internacional.

Para ello, se propone evaluar experimentalmente el efecto de dos variables críticas del proceso fermentativo la temperatura y el tiempo de incubación utilizando levaduras del género *Saccharomyces* bajo condiciones anaeróbicas, con el objetivo de optimizar el rendimiento del proceso y establecer parámetros iniciales reproducibles.

La propuesta se sustenta en un diseño estadístico de superficie de respuesta (FCCCD), que permite analizar interacciones complejas entre variables y modelar la respuesta productiva de forma precisa. Esta metodología ha sido ampliamente validada en procesos fermentativos con otras fuentes de biomasa lignocelulósica, como bagazo de caña, cáscaras de cacao o aserrín, pero hasta la fecha no ha sido aplicada con lodos papeleros en condiciones ecuatorianas. La ejecución del proyecto se realizará a nivel de laboratorio, utilizando recursos disponibles en la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), lo que garantiza la viabilidad técnica y logística de la propuesta.

Desde un enfoque más amplio, esta investigación se articula con los principios de sostenibilidad ambiental y economía circular, al buscar transformar un pasivo ambiental en un recurso energético renovable. Asimismo, contribuye al cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), particularmente en lo relativo al uso responsable de los recursos (ODS 12) y la gestión adecuada de residuos industriales (ODS 6).

## **1.2. Descripción del Problema**

En Ecuador, la industria papeler genera cerca de 25.000 toneladas anuales de residuos sólidos industriales, derivados principalmente de sus procesos de producción y tratamiento de aguas residuales (UTPL, 2024). Entre ellos, los lodos papeleros constituyen uno de los subproductos más abundantes y complejos de gestionar, pues provienen de las etapas de separación físico-química y sedimentación. Estos lodos contienen alta humedad y proporción significativa de lignocelulosa, principalmente celulosa y hemicelulosa, que se

estima representa entre el 60% y 75% de sus sólidos totales. Esta composición, aunque potencialmente valiosa desde el punto de vista energético, termina desaprovechada debido a las prácticas convencionales de disposición.

La mayor parte de los lodos papeleros se destinan a rellenos industriales, mientras un porcentaje menor se deriva al compostaje, lo que implica costos logísticos y pérdida de su valor energético. La fracción orgánica susceptible de ser transformada en bioetanol no es utilizada, lo que representa una pérdida potencial estimada en varios miles de litros de combustible renovable cada año, según estudios preliminares de la propia industria (Chuya & Mancheno, 2024).

En este contexto, se considera como caso de estudio una planta recicladora de papel ubicada en la ciudad de Guayaquil, dedicada a procesar cartón postconsumo, con una generación promedio de 16 toneladas diarias de lodo. Cabe aclarar que estos residuos, que provienen de la línea de tratamiento primario, no son sometidos a procesos de blanqueo adicionales antes de su disposición, lo que disminuye la presencia de compuestos tóxicos y los convierte en un material potencialmente adecuado para procesos biotecnológicos. Esto enlaza con la problemática general, pues a pesar de la disponibilidad de un residuo con alto contenido lignocelulósico, no existe un sistema industrial implementado que permita transformarlo en un biocombustible renovable como el bioetanol.

La transformación de estos lodos papeleros mediante fermentación alcohólica ofrece una alternativa ambientalmente sostenible y económicamente viable. Sin embargo, para hacerlo factible se requiere conocer las condiciones de proceso que afectan el rendimiento de la conversión, particularmente las variables de temperatura y tiempo de incubación durante la fermentación. Estos parámetros influyen de forma directa en la actividad metabólica de las levaduras del género *Saccharomyces*, microorganismos ampliamente utilizados para fermentar azúcares simples liberados tras la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica.

Aun así, existen retos técnicos vinculados a la variabilidad en la composición del lodo a lo largo del tiempo, ya que su generación depende de múltiples factores operativos de la planta recicladora. Dicha variabilidad podría afectar la eficiencia fermentativa y la reproducibilidad de resultados. Por tanto, será necesario caracterizar los lotes de lodo recolectados para conocer sus propiedades, aunque esto no implica controlar la variación, sino únicamente medirla y documentarla.

En síntesis, el problema central se puede expresar en la falta de un esquema experimental local que explore el aprovechamiento de los lodos papeleros como sustrato fermentable para bioetanol, considerando las condiciones ecuatorianas y las características propias de estos residuos. Resolver este vacío permitiría no solo disminuir el volumen de desecho sólido enviado a disposición final, sino además recuperar valor energético que contribuya a una transición hacia sistemas de producción más sostenibles y alineados con principios de economía circular.

### **1.3. Justificación del Problema**

La generación de residuos industriales en Ecuador presenta desafíos para la sostenibilidad, el ambiente y la eficiencia energética. Entre ellos, los lodos papeleros son subproductos de alto volumen y bajo aprovechamiento. Una planta papelera genera unas 16 toneladas diarias, que se disponen principalmente en rellenos industriales o, en menor medida, mediante compostaje. Esta situación no solo implica un costo económico por su tratamiento, sino que representa una oportunidad desperdiciada de valorización energética.

Resolver este problema permitiría transformar un residuo industrial de bajo valor en un recurso estratégico mediante la producción de bioetanol, con aplicaciones energéticas, en transporte e industria. Esta transformación contribuye al fortalecimiento de una economía circular y reduce la presión sobre recursos fósiles. Además, impulsa el desarrollo de

tecnologías limpias y sostenibles dentro del sector papelerero, mejorando su competitividad y cumplimiento de normativas ambientales.

Desde el punto de vista científico, este problema también presenta un vacío de conocimiento relevante. Aunque existen investigaciones internacionales sobre la conversión de biomasa lignocelulósica en bioetanol, son escasos los estudios que aborden específicamente el aprovechamiento de lodos papeleros en condiciones locales. En consecuencia, esta investigación busca generar datos experimentales replicables y adaptados a la realidad ecuatoriana, lo cual resulta clave para el diseño de futuras plantas piloto o escalamientos industriales.

Asimismo, abordar este problema desde una perspectiva experimental permite establecer parámetros de optimización basados en el efecto de la temperatura y el tiempo de incubación durante la fermentación alcohólica. Estos factores son controlables y medibles, lo que asegura la posibilidad de replicar, escalar y aplicar los resultados en contextos reales.

Finalmente, la resolución del problema contribuye al cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible, especialmente el ODS 12 (producción y consumo responsables), al promover la valorización de residuos, y la gestión adecuada de residuos industriales (ODS 6).

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. *Objetivo general***

Evaluar la producción de bioetanol a partir de lodo papelerero pretratado e hidrolizado mediante fermentación alcohólica controlada, evaluando el efecto de la temperatura y el tiempo de incubación, así como su viabilidad económica preliminar, en condiciones de laboratorio.

### 1.4.2. *Objetivos específicos*

- Evaluar el efecto de la temperatura y del tiempo de incubación sobre el rendimiento en la producción de etanol a partir de lodo paplero hidrolizado, utilizando levaduras del género *Saccharomyces* como agente fermentador, bajo condiciones anaeróbicas controladas.
- Identificar las condiciones óptimas de temperatura y tiempo que maximicen la producción de bioetanol por fermentación alcohólica, mediante un diseño de superficie de respuesta con estructura compuesta centrada en el centro de los factores.
- Analizar la viabilidad económica preliminar del proceso de producción de bioetanol a nivel de laboratorio, considerando los costos de insumos, materiales y recursos utilizados en la hidrólisis y fermentación.

## 1.5. Marco teórico

### 1.5.1. *Producción de bioetanol como alternativa energética*

#### **Concepto y tipos de bioetanol**

El bioetanol es un alcohol producido por la fermentación de azúcares presentes en materias primas vegetales, y es uno de los principales biocombustibles líquidos. A diferencia del etanol sintético, proviene de recursos renovables como cultivos, residuos agrícolas o industriales (Alvarado, 2021).

El bioetanol se clasifica según su materia prima y proceso de producción, ver Tabla 1.

**Tabla 1.**

*Clasificación del bioetanol según el tipo de materia prima utilizada*

| <b>Tipo de bioetanol</b> | <b>Materia prima</b>                  | <b>Ejemplos</b>             | <b>Ventajas</b>              | <b>Desventajas</b>                     |
|--------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------------------|
| Primera generación       | Alimentos ricos en azúcares o almidón | Maíz, caña de azúcar, trigo | Alta eficiencia fermentativa | Compite con la producción de alimentos |

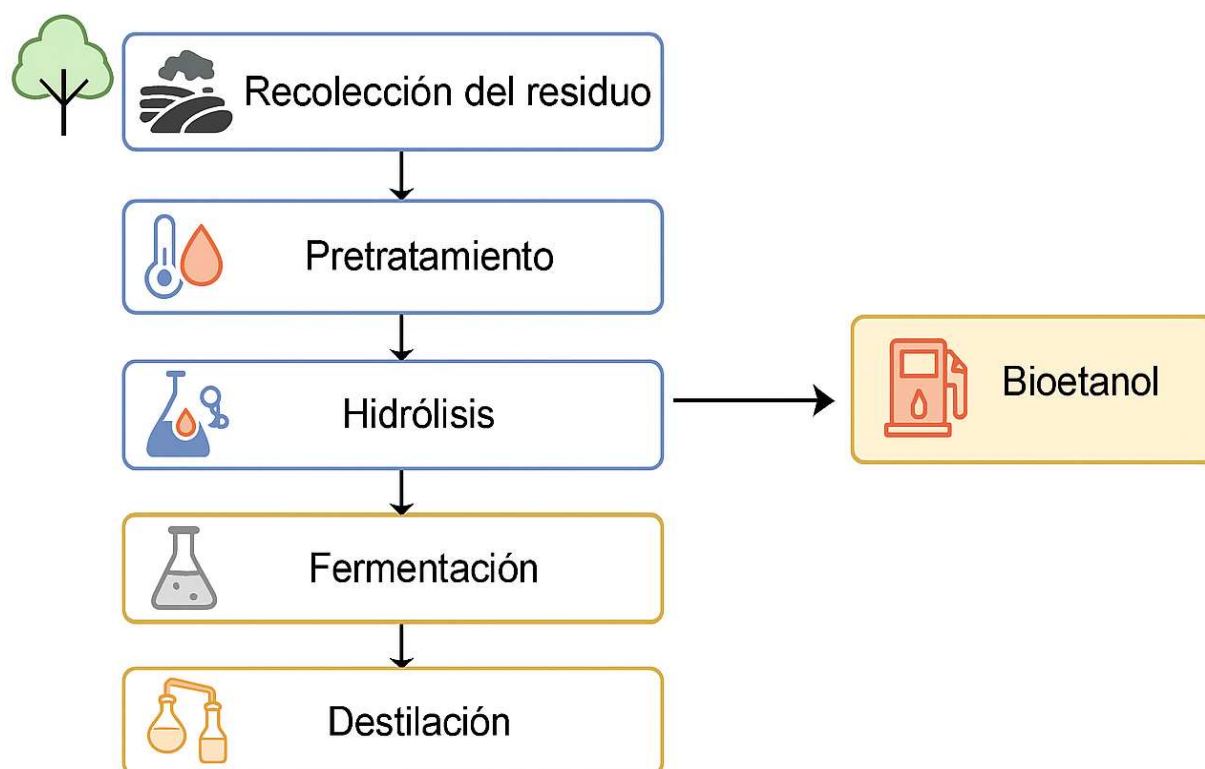
|                    |                                  |                                                 |                                                            |                                                         |
|--------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Segunda generación | Biomasa lignocelulósica          | Bagazo, residuos forestales, paja de arroz      | Aprovecha residuos; menor impacto en seguridad alimentaria | Procesos más complejos (pretratamiento + hidrólisis)    |
| Tercera generación | Algas y microorganismos          | Microalgas, cianobacterias                      | Alta productividad por área cultivada                      | Altos costos tecnológicos; aún en fase de investigación |
| Cuarta generación  | Biomasa genéticamente modificada | Plantas diseñadas para alto contenido de azúcar | Mayor eficiencia potencial                                 | Implicaciones éticas y regulaciones biotecnológicas     |

*Fuente:* Información obtenida de (NIH, 2021)

Para comprender mejor las etapas necesarias en la conversión de biomasa lignocelulósica en bioetanol, se presenta a continuación un esquema que resume el proceso general, desde la recolección del residuo hasta la obtención del biocombustible final.

**Figura 1.**

*Esquema general de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica*



*Nota:* La figura muestra a detalle los pasos para la producción de bioetanol

1.5.2. Biomasa lignocelulósica como materia prima para biocombustibles

Estructura y componentes de la biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica, principal componente estructural vegetal, es una de las fuentes renovables más abundantes. Está compuesta por una matriz compleja y resistente formada principalmente por tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina (Sunil & Kalyan, 2021). Su estructura rígida favorece el crecimiento, pero dificulta su conversión tecnológica en biocombustibles.

La Tabla 2 resume los principales componentes estructurales de la biomasa lignocelulósica, sus características y funciones:

**Tabla 2.**  
*Componentes estructurales de la biomasa lignocelulósica*

| Componente                 | Porcentaje típico (% en base seca) | Función                                                          | Importancia para biocombustibles                                             |
|----------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Celulosa                   | 35–50 %                            | Proporciona soporte estructural (fibras lineales de glucosa)     | Fuente principal de glucosa fermentable                                      |
| Hemicelulosa               | 20–35 %                            | Contribuye a la flexibilidad; polímero ramificado                | Libera azúcares de cinco carbonos (xilosa, arabinosa)                        |
| Lignina                    | 15–30 %                            | Actúa como barrera física y protege frente a ataques microbianos | Dificulta el acceso a la celulosa; puede valorizarse en productos aromáticos |
| Otros (proteínas, cenizas) | <5 %                               | Funciones secundarias y minerales residuales                     | Poca relevancia en la producción de bioetanol                                |

*Nota:* Información obtenida de (Bang & Yuyin, 2025)

### 1.5.3. Hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos

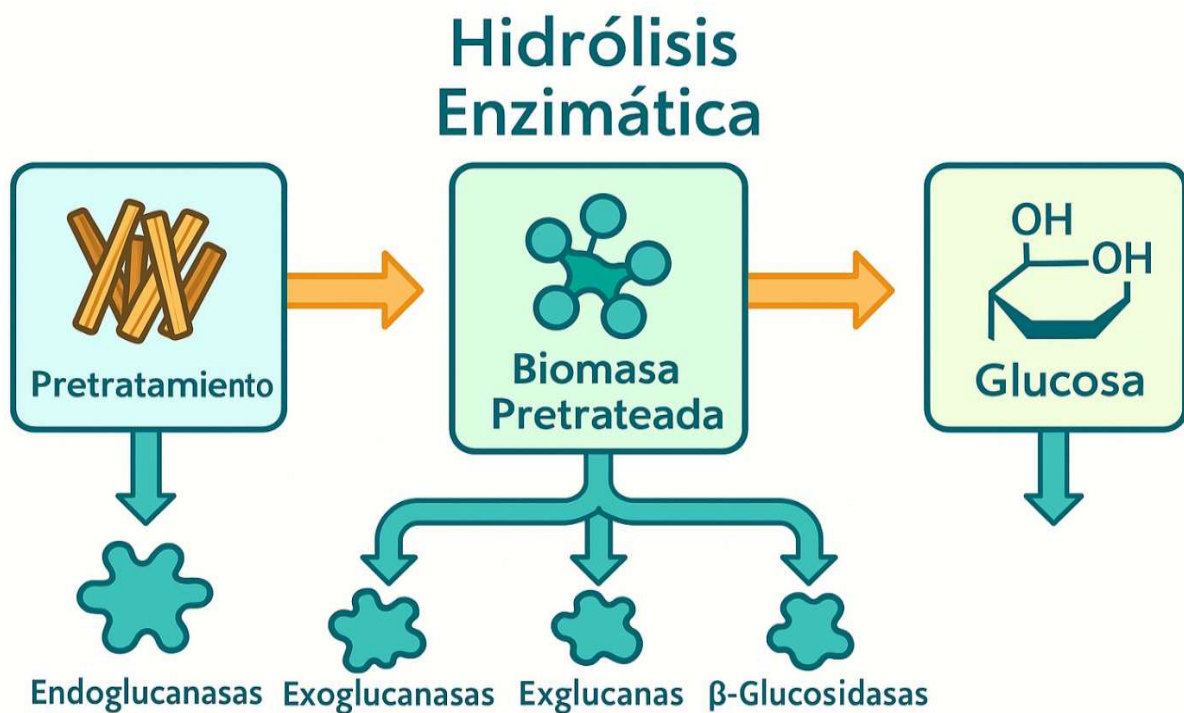
#### Fundamento del proceso de hidrólisis

La hidrólisis enzimática permite transformar la biomasa lignocelulósica en azúcares simples aprovechables en la producción de bioetanol. Este proceso se basa en la ruptura de los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos de la celulosa y hemicelulosa por medio de enzimas especializadas conocidas como celulasas, las cuales actúan bajo condiciones moderadas de temperatura y pH. A diferencia de la hidrólisis química o térmica, la vía enzimática reduce la formación de subproductos inhibidores y favorece la preservación de los azúcares liberados.

En la Figura 2 se ilustra de manera esquemática la acción de estas enzimas sobre el sustrato lignocelulósico.

**Figura 2.**

*Esquema de hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica*



*Nota:* La Figura muestra el proceso a detalle de la Hidrólisis Enzimática

### Parámetros que afectan la eficiencia de la hidrólisis

La eficiencia del proceso de hidrólisis enzimática depende de múltiples factores, tanto inherentes a la biomasa como del entorno experimental. A continuación, la Tabla 5 presenta los principales parámetros que influyen en este proceso, junto con sus efectos y consideraciones.

**Tabla 3.**

*Parámetros que afectan la eficiencia de la hidrólisis enzimática*

| Parámetro                | Descripción                                                   | Efecto en el proceso                                                |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Temperatura              | Óptimo para <i>Trichoderma</i> spp.: 45 °C–55 °C              | Afecta la estabilidad y actividad de las enzimas                    |
| pH                       | Óptimo: 4.5–5.5                                               | Condiciones fuera de rango reducen la actividad catalítica          |
| Carga de sólidos         | Proporción de biomasa en el medio (generalmente 2–10 %)       | Altas cargas pueden aumentar la viscosidad e inhibir difusión       |
| Concentración enzimática | Dosis aplicada del complejo enzimático                        | Afecta la velocidad de conversión; debe balancearse costo/beneficio |
| Tiempo de reacción       | Duración de la hidrólisis (24–72 h típicamente)               | Tiempos cortos pueden resultar en conversión incompleta             |
| Presencia de inhibidores | Subproductos del pretratamiento: ácidos, compuestos fenólicos | Pueden inactivar enzimas o reducir su afinidad por el sustrato      |

*Nota:* Información obtenida de (Seiboth, 2020)

#### 1.5.4. Variables críticas en la optimización del proceso

La producción de bioetanol a partir de lodos lignocelulósicos depende de optimizar variables clave durante la fermentación alcohólica. Entre estas variables, la temperatura y el tiempo de incubación son determinantes, pues afectan la actividad de las levaduras, la estabilidad enzimática y la acumulación del producto final.

### Efecto de la temperatura de fermentación

La temperatura es una variable crítica en la fermentación, ya que regula el crecimiento de levaduras, la actividad enzimática y la producción de etanol. Temperaturas bajas reducen el metabolismo, mientras que las altas causan desnaturalización enzimática, pérdida celular y generación de compuestos indeseables (Hosam, 2024).

La Tabla 4 presenta los efectos típicos de distintos rangos de temperatura sobre el comportamiento de *Saccharomyces cerevisiae* en procesos de fermentación alcohólica.

**Tabla 4.**

*Comportamiento fermentativo de S. cerevisiae según temperatura*

| Temperatura (°C) | Efecto sobre el proceso                                               |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| < 25 °C          | Lento metabolismo, mayor duración de fermentación                     |
| 30–35 °C         | Rango óptimo: máxima velocidad de conversión y rendimiento de etanol  |
| 36–40 °C         | Tolerable, pero con estrés celular moderado                           |
| > 40 °C          | Inhibición de crecimiento, desactivación enzimática, menor producción |

*Nota:* Información obtenida de (Benavides, 2020)

En este estudio se evaluarán tres niveles de temperatura: 25 °C, 30 °C y 335 °C, con el objetivo de explorar el comportamiento de *S. cerevisiae* en condiciones de tolerancia térmica moderada, potencialmente útiles para procesos industriales en climas cálidos.

### Impacto del tiempo de incubación

El tiempo de incubación es otra variable crítica, ya que determina el grado de conversión de azúcares en etanol. Tiempos cortos generan fermentación incompleta, y periodos prolongados pueden acumular inhibidores o provocar que las levaduras reutilicen el etanol como sustrato.

El efecto del tiempo también depende de la temperatura y concentración inicial de azúcares, por lo que deben evaluarse conjuntamente (Guindal, 2024).

La Tabla 5 muestra una comparación general de los efectos asociados a distintos tiempos de fermentación.

**Tabla 5.**

*Efecto del tiempo de incubación en fermentación alcohólica*

| Tiempo (h) | Ventajas                                           | Desventajas                                      |
|------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 24         | Fermentación rápida; menor riesgo de contaminación | Conversión incompleta de azúcares                |
| 48         | Equilibrio entre rendimiento y eficiencia temporal | Riesgo moderado de inhibidores                   |
| 72         | Conversión completa; alto rendimiento esperado     | Mayor riesgo de acumulación de subproductos      |
| >72        | Posible reutilización de etanol por la levadura    | Pérdida de eficiencia; condiciones desfavorables |

*Nota:* Información obtenida de (Guindal, 2024)

## Capítulo 2

## **2. Metodología**

### **2.1. Tipo de investigación y enfoque metodológico**

Esta investigación se planteó como un trabajo experimental aplicado, desarrollado en condiciones controladas de laboratorio, tuvo como propósito analizar la influencia de variables de operación (tiempo de incubación y temperatura) sobre la producción de bioetanol empleando lodo papelerero como sustrato. El enfoque metodológico se enmarca en un enfoque cuantitativo, sustentado en la obtención, tratamiento y contraste de información experimental a través de ensayos de fermentación alcohólica, con medición del producto de interés (etanol) y análisis estadístico posterior.

Se adoptó un Diseño de Superficie de Respuesta (RSM) con estructura compuesta centrada en el centro de los factores (FCCCD), el cual permite modelar relaciones entre las variables independientes (temperatura y tiempo) y la variable de respuesta (rendimiento de etanol), así como determinar condiciones óptimas de operación. La aplicación de esta metodología permitió identificar y cuantificar los efectos individuales y combinados de las variables, además de facilitar la optimización del proceso biotecnológico bajo estudio.

### **2.2. Caracterización del residuo lignocelulósico**

#### ***2.2.1. Origen y recolección del lodo papelerero***

El residuo lignocelulósico utilizado en esta investigación fue lodo papelerero húmedo generado por el proceso de reciclaje de cartón postconsumo en una empresa papelería ubicada en la provincia del Guayas. Este subproducto proviene del sistema de tratamiento primario de aguas residuales industriales y corresponde al material sólido retenido tras la decantación y separación de fibras residuales no recuperadas durante la fabricación de papel reciclado.

El lodo empleado en este estudio fue recolectado directamente del sedimentador primario, antes de que el residuo sea sometido a procesos de compostaje o disposición final en relleno industrial. Se seleccionó este punto de muestreo debido a que el lodo conserva su

composición original rica en celulosa y hemicelulosa, lo cual es crucial para su aprovechamiento biotecnológico. Además, este residuo específico no ha sido sometido a procesos de blanqueo, reduciendo así el riesgo de presencia de compuestos tóxicos como dioxinas o clorados que inhiben la actividad microbiana.

### ***2.2.2. Proceso experimental para la obtención de muestras***

La recolección de muestras se realizó en dos jornadas de muestreo en la planta de tratamiento de aguas residuales de la industria papelera. En la primera jornada se recolectó muestra sólida, donde se extrajeron aproximadamente 20 kg de lodo. En la segunda jornada, se recolectó muestra líquida, obteniéndose 15 kg de lodo. Ambas muestras fueron homogenizadas manualmente en el sitio para garantizar la representatividad del lote. El material fue transportado en contenedores cerrados hasta el laboratorio de investigación, donde fue conservado bajo refrigeración a una temperatura aproximada de 4 °C hasta el inicio de los ensayos experimentales

Esta conservación bajo refrigeración fue clave para minimizar la actividad microbiana espontánea que pudiera alterar la composición del sustrato, garantizando la estabilidad de ambas fracciones durante el período de almacenamiento a corto plazo.

### ***2.2.3. Parámetros físico-químicos evaluados (humedad, pH, sólidos totales)***

Previo al pretratamiento y uso experimental, se realizó una caracterización básica del lodo paplero con el fin de conocer sus propiedades más relevantes. Las muestras fueron tomadas en dos jornadas de muestreo: una para lodo sólido, en la que se extrajeron aproximadamente 20 kg de lodo, y otra para lodo líquido, en la que se recolectaron 15 kg de lodo.

Los parámetros analizados incluyeron:

- **Humedad (%):** determinada por método gravimétrico, mediante secado en estufa a 105 °C hasta peso constante.

- **pH:** medido directamente en suspensión líquida con potenciómetro, realizando tres mediciones por muestra.
- **Sólidos totales (%):** calculados por diferencia entre el peso inicial y el peso seco de la muestra.

Estos parámetros permitieron establecer las condiciones iniciales del sustrato, especialmente la proporción de materia seca disponible para reacciones posteriores.

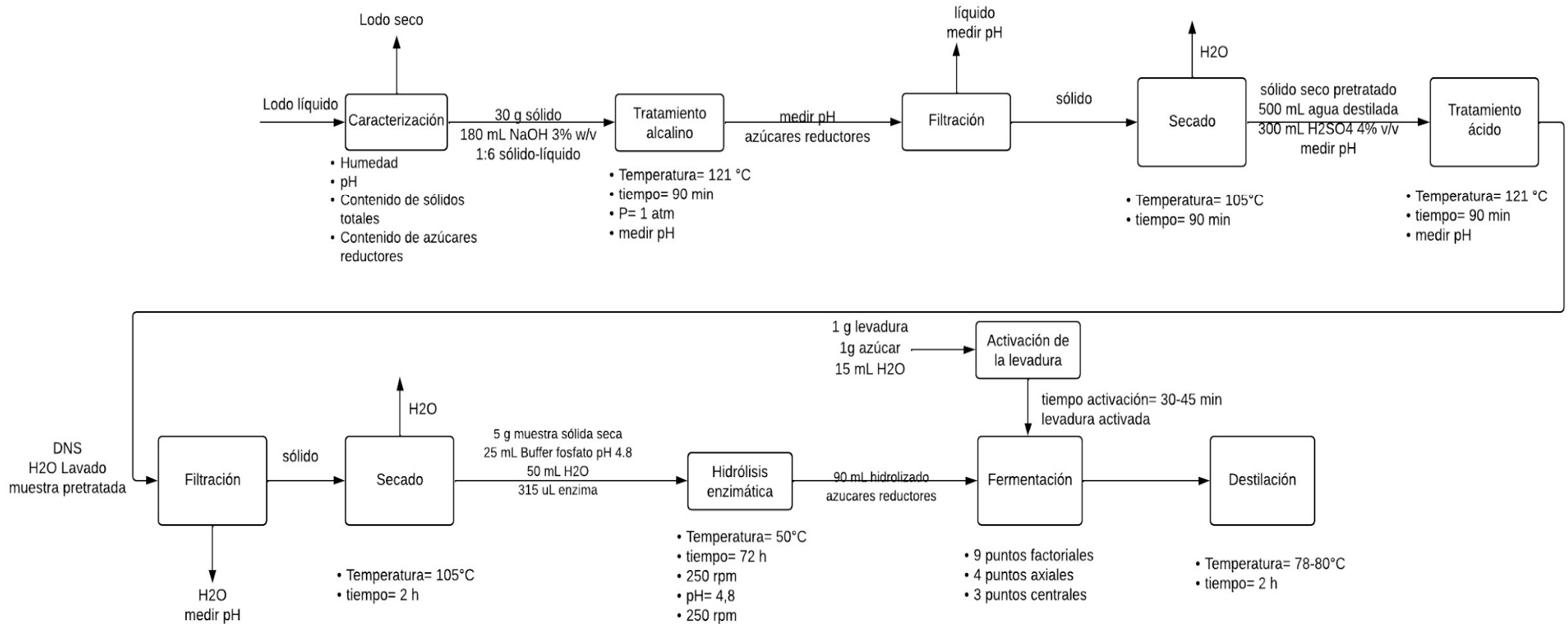
### 2.3. Pretratamiento del lodo

Con el objetivo de facilitar la hidrólisis de la fracción celulósica presente en el lodo paplero y aumentar la accesibilidad de las fibras lignocelulósicas a las enzimas hidrolíticas, se aplicó un pretratamiento químico secuencial de naturaleza alcalina y ácida. Este tipo de pretratamiento ha demostrado ser eficaz para la ruptura de enlaces estructurales en biomasa residual, permitiendo la solubilización parcial de hemicelulosas y la remoción parcial de lignina. Este procedimiento se diseñó en base a metodologías previamente utilizadas por (Loayza, 2020) para residuos lignocelulósicos similares, ajustando condiciones específicas al tipo de residuo empleado en este estudio.

El flujo general del pretratamiento y procesamiento del lodo paplero se representa en la Figura 3 (para muestras líquidas) y en la Figura 4 (para muestras húmedas), donde se detallan cada una de las etapas experimentales desde la caracterización hasta la destilación.

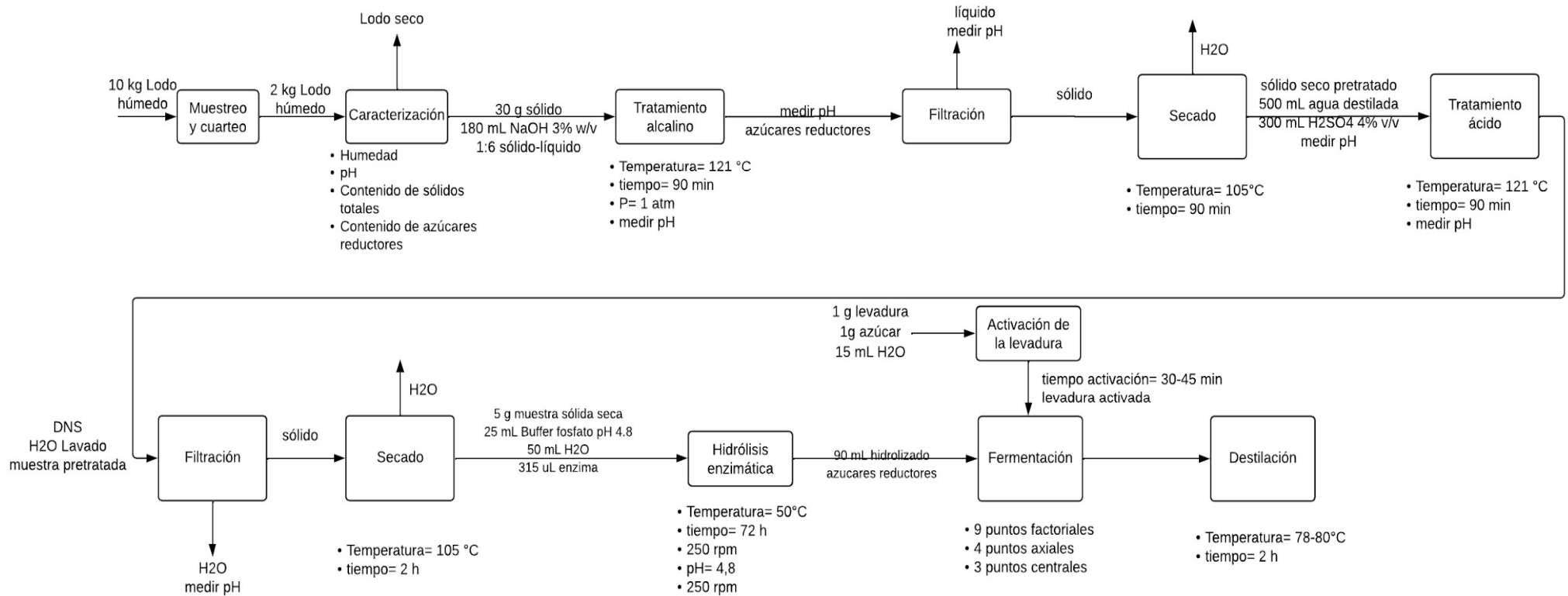
**Figura 3.**

*Diagrama de flujo del procesamiento de lodo líquido para la producción de bioetanol*



**Figura 4.**

*Diagrama de flujo del procesamiento de lodo húmedo para la producción de bioetanol*



### **2.3.1. Pretratamiento alcalino con NaOH**

Para iniciar la ruptura de la estructura lignocelulósica del lodo paplero, se realizó un pretratamiento alcalino con hidróxido de sodio (NaOH) al 3 % (p/v). Se pesaron 30 g de lodo húmedo y se mezclaron con 180 mL de la solución alcalina previamente preparada (relación sólido/líquido de 1:6).

La mezcla fue transferida a frascos de vidrio resistentes a presión y sometida a autoclavado a 121 °C durante 90 minutos a 1 atm. Este procedimiento buscó provocar la ruptura de enlaces éster y glicosídicos entre la lignina y los polisacáridos estructurales, favoreciendo la delignificación parcial.

Finalizado el autoclavado, se permitió el enfriamiento de la mezcla a temperatura ambiente. Luego, se midió el pH resultante y se realizaron lavados sucesivos con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro (6.5–7.0), a fin de eliminar los residuos de alcalinidad que pudieran interferir en las etapas siguientes. Posteriormente, se realizó una filtración y se conservó una alícuota de 10 mL del líquido residual para análisis de azúcares reductores mediante DNS. El sólido retenido fue secado como se describe en el apartado siguiente.

### **2.3.2. Secado y filtración**

El sólido recuperado tras el pretratamiento alcalino fue separado por filtración utilizando una tela estéril y embudo Büchner. Posteriormente, se colocó en bandejas y se secó en una estufa con ventilación forzada a 105 °C durante 90 minutos, hasta alcanzar una textura parcialmente deshidratada adecuada para el tratamiento ácido.

### **2.3.3. Pretratamiento ácido con $H_2SO_4$**

Una vez seco el sólido, se realizó un segundo pretratamiento utilizando ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) diluido al 4 % (v/v). La mezcla fue sometida a autoclavado a 121 °C durante 90 minutos, lo cual permitió la hidrólisis parcial de hemicelulosas y la liberación de oligómeros solubles, además de una despolimerización leve de la celulosa amorfa. Al

finalizar el tratamiento, se midió el pH resultante, se separó el líquido residual por filtración y se conservó una alícuota de 10 mL para posterior análisis de azúcares reductores. El sólido tratado fue retenido para las etapas posteriores.

#### **2.3.4. Secado final y conservación del sólido**

El sólido tratado con ácido fue nuevamente filtrado y escurrido, para luego colocarse en bandejas limpias y secarse en estufa a 105 °C durante 2 horas. El producto final fue un sólido de color marrón claro, de consistencia semigranular y bajo contenido de humedad.

**Tabla 6.**

*Parámetros del pretratamiento alcalino y ácido aplicado al lodo papelerero*

| <b>Tipo de pretratamiento</b> | <b>Agente químico</b>          | <b>Concentración</b> | <b>Relación masa/volumen</b> | <b>Temperatura (°C)</b> | <b>Tiempo (min)</b> | <b>Técnica aplicada</b> |
|-------------------------------|--------------------------------|----------------------|------------------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| Alcalino                      | NaOH                           | 3 % (p/v)            | 1:06                         | 121                     | 90                  | Autoclavado             |
| Ácido                         | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 4 % (v/v)            | Aproximadamente<br>1:2.7     | 121                     | 180                 | Autoclavado             |

#### **2.4. Hidrólisis enzimática**

Con el objetivo de liberar los azúcares fermentables presentes en la fracción celulósica del lodo papelerero pretratado, se llevó a cabo una hidrólisis enzimática utilizando un cóctel de celulasas de origen fúngico (*Trichoderma* spp.). Esta etapa fue crítica para garantizar la disponibilidad de monosacáridos en el medio de fermentación, permitiendo una posterior conversión eficiente a etanol.

##### **2.4.1. Condiciones de incubación y preparación del inóculo enzimático**

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL, añadiendo 20 g de lodo pretratado seco y 100 mL del buffer citrato pH 4.8 por unidad experimental. Posteriormente, se adicionó el cóctel de enzimas comerciales provenientes de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich), en una concentración de 15 FPU/g de sustrato seco.

Esta dosis fue seleccionada con base en literatura especializada sobre hidrólisis de biomasa lignocelulósica de origen similar.

Los frascos fueron incubados en baño maría con agitación constante (120 rpm) a 50 °C durante 48 horas, asegurando condiciones isotérmicas y homogéneas que favorecieran la acción enzimática. A lo largo del proceso, se tomaron muestras a distintos intervalos para el seguimiento cinético de la liberación de azúcares fermentables, que luego serían cuantificados mediante el método colorimétrico DNS.

A continuación, la Tabla 7 presenta un resumen de los principales parámetros experimentales empleados durante la etapa de hidrólisis enzimática.

**Tabla 7.**

*Parámetros experimentales de la hidrólisis enzimática del lodo paplero pretratado*

| <b>Parámetro</b>          | <b>Valor aplicado</b>                     |
|---------------------------|-------------------------------------------|
| Volumen de matraz         | 250 mL                                    |
| Masa de lodo seco         | 20 g                                      |
| Volumen de buffer citrato | 100 mL                                    |
| pH del medio              | 4.8                                       |
| Enzima utilizada          | <i>Trichoderma reesei</i> (Sigma-Aldrich) |
| Dosis enzimática          | 15 FPU/g de sustrato seco                 |
| Temperatura de incubación | 50 °C                                     |
| Tiempo de incubación      | 48 horas                                  |
| Agitación                 | 120 rpm                                   |
| Toma de muestras          | Varias durante el proceso                 |

#### **2.4.2. Conservación de muestras para DNS**

Las muestras recolectadas durante la hidrólisis fueron centrifugadas a 6000 rpm durante 10 minutos para separar el sobrenadante, el cual contenía los azúcares solubles. Cada alícuota fue transferida a tubos Eppendorf rotulados y almacenada a -20 °C hasta su análisis mediante el método colorimétrico DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico).

Este procedimiento permitió conservar los metabolitos sin alteración estructural ni degradación por microorganismos o enzimas residuales, garantizando así la precisión del análisis de azúcares fermentables.

#### **2.4.3. Verificación de la actividad enzimática**

Antes de proceder con los ensayos de hidrólisis, se verificó la actividad enzimática del cóctel celulolítico mediante el protocolo estandarizado para la determinación de actividad celobiasasa, recomendado por la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) y descrito por (Ghose, 1987).

Para ello, se utilizó como sustrato una solución fresca de celobiosa al 15 mM preparada en buffer fosfato pH 4.8. Se incubaron 1 mL de diluciones del preparado enzimático con 1 mL de la solución de celobiosa a 50 °C durante 30 minutos. La reacción se detuvo mediante inmersión en baño de agua hirviendo por 5 minutos, y tras enfriamiento, se cuantificó la glucosa liberada utilizando un kit colorimétrico basado en la reacción glucosa oxidasa-peroxidasa (GOD-POD). Se incluyeron blancos de sustrato y enzima para corregir la absorbancia por interferencias y fondo.

La actividad celobiasasa (CBU) se estimó de acuerdo con la liberación de 1 mg de glucosa a partir de celobiosa bajo condiciones estandarizadas. Según Ghose (1987), la unidad se define como:

$$CBU = \frac{0.0926}{C_e} \quad (2.1)$$

$C_e$  es la concentración de enzima (en mL<sup>-1</sup>) que libera exactamente 1.0 mg de glucosa en 30 minutos. Esta relación considera que 1.0 mg de glucosa corresponde a 0.0926 μmol·min<sup>-1</sup>·mL<sup>-1</sup> de celobiasasa activa.

Este procedimiento permitió confirmar que el preparado enzimático conservaba una actividad catalítica adecuada antes de su empleo en la hidrólisis del lodo papelerero.

#### **2.4.4. Cuantificación de azúcares reductores (DNS)**

Para determinar la efectividad del proceso de hidrólisis enzimática, se utilizó la técnica colorimétrica DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), que permite identificar los grupos aldehído presentes en azúcares reductores. Las muestras previamente congeladas fueron descongeladas, centrifugadas y mezcladas con reactivo DNS en proporción 1:1. La mezcla se calentó mediante calentamiento en baño maría a 95 °C por un lapso de 5 minutos, posteriormente se permitió el enfriamiento a temperatura ambiente y se registró la absorbancia a 540 nm utilizando un equipo espectrofotométrico UV-Vis.

Con fines de cuantificación, se elaboró una curva de calibración empleando soluciones patrón de glucosa en un rango de concentraciones entre 0.3 y 2 mg/mL. Cada punto fue evaluado por duplicado y se calculó el promedio de absorbancia.

#### **2.5. Diseño experimental**

Con el propósito de optimizar la producción de bioetanol a partir de lodo papелero pretratado e hidrolizado, se aplicó una metodología estadística basada en diseño de experimentos (DOE, por sus siglas en inglés), específicamente el diseño de superficie de respuesta (RSM). Esta herramienta permitió evaluar simultáneamente el efecto de dos variables independientes clave sobre el rendimiento fermentativo, considerando además sus posibles interacciones y la presencia de efectos no lineales.

##### **2.5.1. Selección de variables: Temperatura y tiempo de incubación**

Las variables seleccionadas para el análisis fueron la temperatura de fermentación (°C) y el tiempo de incubación (horas), debido a su influencia directa sobre la actividad metabólica de las levaduras y la eficiencia global del proceso fermentativo. Estudios previos han demostrado que estas condiciones determinan tanto la velocidad de conversión de azúcares como la estabilidad de los microorganismos involucrados (*Saccharomyces cerevisiae*), impactando el rendimiento de etanol obtenido.

Se establecieron rangos de temperatura entre 35,86 °C y 64,14 °C, y tiempos de incubación entre 14,06 y 81,94 horas, abarcando condiciones reales de laboratorio y extendiendo los límites para detectar posibles comportamientos no lineales.

### **2.5.2. Justificación del diseño FCCCD**

El diseño seleccionado fue un Diseño Compuesto Central Centrado en el Centro (FCCCD, por sus siglas en inglés), el cual permite modelar superficies de respuesta cuadráticas mediante la combinación de puntos factoriales, puntos axiales y réplicas en el centro. Esta estructura es especialmente útil para detectar interacciones entre variables y encontrar condiciones óptimas dentro de un espacio experimental restringido.

El FCCCD proporciona una adecuada capacidad predictiva, reduce el número de experimentos requeridos en comparación con otros diseños completos y permite realizar ajustes de segundo orden. Además, facilita la construcción de modelos empíricos mediante regresión múltiple para describir la respuesta en función de las variables independientes.

### **2.5.3. Matriz experimental de 16 ensayos**

La matriz experimental contempló un total de 16 ensayos, incluyendo 9 puntos factoriales, 4 puntos axiales y 3 réplicas en el centro. Cada combinación de temperatura y tiempo de incubación fue probada bajo condiciones anaeróbicas controladas y con igual concentración de inóculo de levaduras activadas.

A continuación, la Tabla 8 presenta la distribución completa de los ensayos experimentales realizados, indicando el tipo de punto correspondiente dentro del diseño FCCCD:

**Tabla 8.**

*Matriz experimental basada en diseño FCCCD para la producción de bioetanol*

| Ensayo | Temperatura (°C) | Tiempo de incubación (h) | Tipo de punto |
|--------|------------------|--------------------------|---------------|
| 1      | 25               | 24                       | Factorial     |

|    |    |    |           |
|----|----|----|-----------|
| 2  | 25 | 48 | Factorial |
| 3  | 25 | 72 | Factorial |
| 4  | 30 | 24 | Factorial |
| 5  | 30 | 48 | Factorial |
| 6  | 30 | 72 | Factorial |
| 7  | 35 | 24 | Factorial |
| 8  | 35 | 48 | Factorial |
| 9  | 35 | 72 | Factorial |
| 10 | 23 | 48 | Axial     |
| 11 | 37 | 48 | Axial     |
| 12 | 30 | 14 | Axial     |
| 13 | 30 | 82 | Axial     |
| 14 | 30 | 48 | Central   |
| 15 | 30 | 48 | Central   |
| 16 | 30 | 48 | Central   |

---

## 2.6. Fermentación alcohólica

### 2.6.1. Condiciones anaeróbicas y parámetros controlados

La fermentación alcohólica se realizó en condiciones estrictamente anaeróbicas, esenciales para asegurar la conversión de azúcares fermentables en etanol por parte de las levaduras. Para ello, se utilizaron frascos herméticos tipo Duran de 250 mL con válvulas de exclusión de gases y trampas de aire que permitieron la salida de CO<sub>2</sub> sin ingreso de oxígeno.

La temperatura de fermentación fue controlada mediante incubadoras de temperatura constante, fijada según el diseño experimental. La agitación fue suave (120 rpm) y continua para mantener homogéneo el medio, sin alterar la condición anaeróbica.

### 2.6.2. Procedimiento experimental por ensayo

Cada frasco de fermentación contenía 99 mL del sobrenadante hidrolizado, previamente ajustado al pH óptimo (4.8), al que se le adicionó el inóculo de levadura activada en una proporción del 10 % (v/v). El proceso fermentativo duró entre 24 y 72 horas, según el ensayo correspondiente.

Durante la fermentación se monitoreó la temperatura, el pH, y el volumen de gas producido como indicativo del progreso metabólico. Al finalizar el ensayo, se centrifugaron las muestras a 5000 rpm por 10 minutos para separar el etanol presente en el sobrenadante, destinado a su posterior cuantificación.

### ***2.6.3. Activación de levaduras y preparación del inóculo***

Con el fin de llevar a cabo la fermentación alcohólica, se activaron levaduras comerciales del género *Saccharomyces cerevisiae*. El proceso inició con la rehidratación de 1.6 g de levadura seca activa en 20 mL de agua destilada tibia (35 °C), a la que se añadió una cucharadita de glucosa como fuente inicial de energía.

La mezcla fue dejada en reposo durante 20 minutos, seguida de una agitación leve para promover la activación celular. Posteriormente, se inoculó en un medio de enriquecimiento compuesto por extracto de levadura 0.5 % y glucosa 2 %, incubado durante 4 horas a 30 °C en agitación constante (120 rpm).

Una vez alcanzada una densidad óptica visible (aproximadamente 1.0 a 600 nm), se procedió a la inoculación directa del medio fermentativo, asegurando una proporción 10 % (v/v) de inóculo sobre el volumen total del medio.

### **2.7. Destilación y cuantificación de etanol**

El etanol producido fue recuperado mediante destilación simple a baja temperatura. Para ello, se utilizó una unidad de destilación con balones de 250 mL, columnas de vidrio y refrigerantes Liebig. Se destilaron 99 mL del medio fermentado y se recolectó la fracción que alcanzó a destilarse en cada muestra, correspondiente al rango de ebullición del etanol (78.5 °C). Posteriormente, el etanol recuperado fue cuantificado mediante refractómetro, validando la presencia del compuesto con análisis por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), a fin de comprobar la identidad del etanol en las muestras. Adicionalmente, se determinó la densidad de los destilados como parámetro complementario de verificación.

## Capítulo 3

3. Resultados y análisis

3.1. Caracterización del lodo paplero

3.1.1. Humedad, sólidos totales y pH

La caracterización inicial del lodo paplero constituye un paso fundamental para conocer su composición y evaluar su aptitud como materia prima en la producción de bioetanol. En esta etapa se determinaron tres parámetros básicos: humedad absoluta, porcentaje de sólidos totales y pH promedio. Los resultados se resumen en la Tabla 9.

**Tabla 9.**  
*Parámetros físico-químicos iniciales del lodo paplero*

| Tipo de lodo | Humedad absoluta<br>(%) | Sólidos totales<br>(%) | pH promedio |
|--------------|-------------------------|------------------------|-------------|
| Lodo líquido | 98.56                   | 1.44                   | 6.44        |
| Lodo húmedo  | 75.81                   | 24.19                  | 7.46        |

3.1.2. Interpretación de la caracterización

El alto contenido de humedad del lodo líquido (98.56 %) coincide con los valores reportados en la literatura para residuos papleros tras el tratamiento primario, los cuales suelen superar el 95 % de humedad y contener entre 1–2 % de sólidos totales (Pérez, 2016). Aunque esta condición limita su densidad energética y dificulta el almacenamiento prolongado, facilita su manipulación, transporte y bombeo.

Por su parte, el lodo húmedo, con 24.9 % de sólidos, se encuentra en el rango descrito para fracciones semisólidas de lodos papleros (20–30 % de sólidos, según (Chuya & Mancheno, 2024), lo que lo hace más adecuado para hidrólisis y fermentación al aportar mayor cantidad de materia lignocelulósica aprovechable.

En cuanto al pH, los valores de 6.44 y 7.46 se ubican dentro de los rangos compatibles para iniciar procesos de hidrólisis y fermentación alcohólica (pH óptimo 4.5–7.5), lo que asegura la viabilidad de aplicar procesos químicos y enzimáticos sin necesidad de

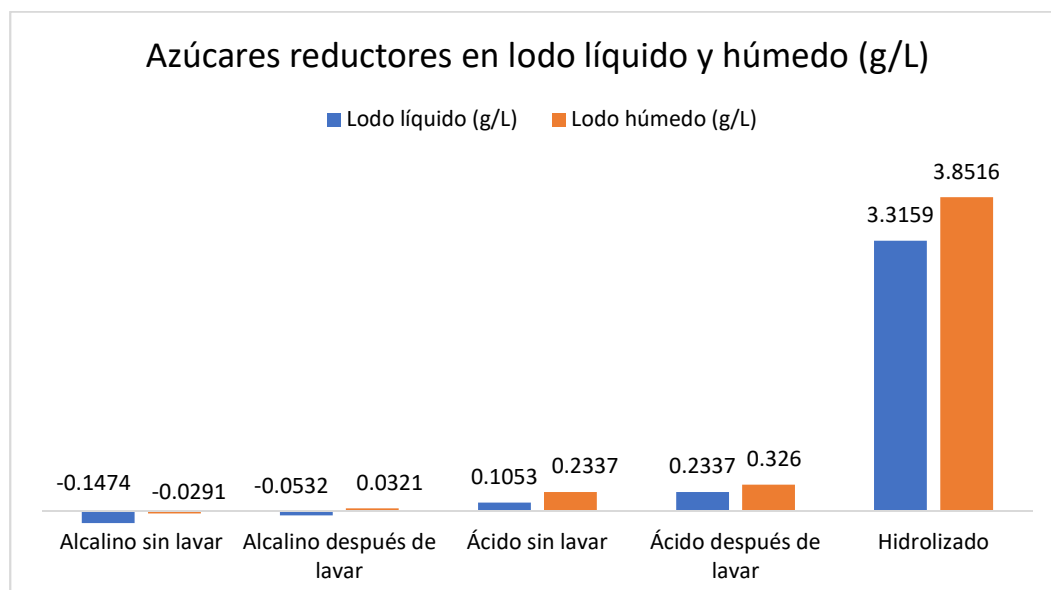
correcciones extremas. Sin embargo, en el caso del lodo líquido será necesario implementar estrategias de concentración o secado que incrementen la accesibilidad de las enzimas al sustrato.

### **3.2. Pretratamiento del lodo paplero**

#### ***3.2.1. Resultados del pretratamiento alcalino y ácido***

El pretratamiento del lodo paplero mediante tratamientos alcalinos y ácidos permitió evaluar la liberación inicial de carbohidratos disponibles en las dos fracciones estudiadas (lodo líquido y húmedo). Los resultados obtenidos evidencian que el tratamiento ácido después del lavado generó mayores concentraciones que el alcalino en ambos casos, lo que indica una mejor solubilización de azúcares bajo estas condiciones.

En el lodo líquido, los valores fueron bajos en todos los pretratamientos, con una liberación máxima de 0.2337 g/L tras el tratamiento ácido con lavado. En el lodo húmedo las concentraciones resultaron superiores, alcanzando 0.3260 g/L en el tratamiento ácido después de lavar. Ver Figura 5.

**Figura 5.***Azúcares reductores en lodo líquido y húmedo (g/L)*

Estos resultados confirman que el pretratamiento ácido resultó más eficiente que el alcalino y que la fracción de lodo húmedo ofrece una mayor disponibilidad de azúcares desde las etapas iniciales del proceso.

### **3.2.2. Cambios en parámetros físico-químicos**

Los análisis iniciales mostraron diferencias importantes entre el lodo líquido y el húmedo en términos de sólidos totales y carbohidratos disponibles. El lodo húmedo presentó un 24.19 % de sólidos totales frente al 1.44 % del lodo líquido, lo que explica la mayor concentración de azúcares observada en esta fracción.

En el lodo líquido, las concentraciones de carbohidratos oscilaron entre 0.0133 y 0.0147 g/L, reflejando un contenido reducido de azúcares estructurales. En contraste, en el lodo húmedo los valores estuvieron entre 0.0422 y 0.0475 g/L, aproximadamente tres veces más altos (Tabla 10).

**Tabla 10.***Cuantificación de carbohidratos en lodo líquido y húmedo*

| <b>Dilución</b> | <b>Absorbancia lodo líquido</b> | <b>Absorbancia lodo húmedo</b> | <b>Concentración lodo líquido (g/L)</b> | <b>Concentración lodo húmedo (g/L)</b> |
|-----------------|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|
| 1/60            | 0.204                           | 0.903                          | 0.0110                                  | 0.0500                                 |
| 1/60            | 0.211                           | 0.968                          | 0.0114                                  | 0.0536                                 |
| <b>Promedio</b> | 0.2075                          | 0.9355                         | 0.0112                                  | 0.0518                                 |
| 1/70            | 0.237                           | 0.812                          | 0.0128                                  | 0.0449                                 |
| 1/70            | 0.239                           | 0.836                          | 0.0129                                  | 0.0463                                 |
| <b>Promedio</b> | 0.2380                          | 0.8240                         | 0.0129                                  | 0.0456                                 |

**3.2.3. Rendimiento y análisis comparativo**

El análisis comparativo entre ambas fracciones confirma que el lodo húmedo presenta una disponibilidad significativamente mayor de carbohidratos y azúcares reductores en todas las etapas del pretratamiento. El valor máximo de carbohidratos en el lodo húmedo triplicó al obtenido en el lodo líquido, lo que lo convierte en una fracción más favorable para los procesos posteriores de hidrólisis y fermentación.

En términos prácticos, la elección del lodo húmedo como sustrato incrementa la eficiencia potencial de la producción de bioetanol, al ofrecer una base más rica en azúcares fermentables.

**3.3. Hidrólisis enzimática****3.3.1. Verificación de la actividad enzimática**

La verificación de la actividad enzimática se realizó a partir de diluciones seriadas de la solución de celulasa, midiendo la absorbancia y calculando la concentración de glucosa liberada en cada caso. Con base en estos datos se determinaron la actividad enzimática (FPU/mL), la actividad total (U) y la actividad específica (U/g) empleando las siguientes expresiones:

$$\text{Actividad enzimática} \left( \frac{U}{mL} \right) = \frac{\text{Glucosa total (mg)}}{\text{Peso molecular de glucosa} \left( \frac{mg}{mmol} \right) \times \text{Volumen de enzima (mL)}} \quad (3.1)$$

$$\text{Actividad total (U)} = \text{Actividad enzimática} \left( \frac{U}{mL} \right) \times \text{Volumen total} \quad (3.2)$$

$$\text{Actividad específica} \left( \frac{U}{g} \right) = \frac{\text{Actividad total (U)}}{\text{Peso enzima (g)}} \quad (3.3)$$

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 11, donde se observa un incremento progresivo en los valores de actividad enzimática, total y específica conforme aumenta la concentración de glucosa liberada.

**Tabla 11.**

*Resultados promedio de la determinación de la actividad enzimática*

| <b>Dilución</b> | <b>Actividad enzimática<br/>(FPU/mL)</b> | <b>Actividad total<br/>(U)</b> | <b>Actividad específica<br/>(U/g)</b> |
|-----------------|------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| 1:40            | 0.0966                                   | 2.3660                         | 473.20                                |
| 1:20            | 0.1350                                   | 3.3084                         | 661.68                                |
| 1:10            | 0.2142                                   | 5.2466                         | 1049.32                               |
| 1:05            | 0.3517                                   | 8.6151                         | 1723.03                               |

### **3.3.2. Liberación de carbohidratos y azúcares reductores**

Los resultados experimentales evidenciaron una clara relación entre la concentración de glucosa liberada y la actividad enzimática obtenida. En las diluciones más bajas (1:40), la actividad específica alcanzó valores entre 443 y 503 U/g, mientras que en las diluciones más concentradas (1:05) se registraron los valores máximos, con 1740 U/g.

Estos resultados confirman que la enzima empleada presentó una alta capacidad catalítica, liberando cantidades crecientes de glucosa a medida que se incrementó la

concentración del sustrato. La reproducibilidad entre duplicados fue adecuada, con diferencias mínimas en absorbancia y concentración, lo que refuerza la confiabilidad del procedimiento experimental.

### **3.3.3. Resultados comparativos entre lodo líquido y húmedo**

Comparando ambas fracciones, se observa que el incremento de la actividad enzimática repercutió directamente en la liberación de azúcares reductores durante la hidrólisis. El lodo húmedo mostró valores más altos de azúcares disponibles en todas las etapas, alcanzando 3.85 g/L en el hidrolizado, frente a 3.32 g/L en el lodo líquido.

Estos resultados son consistentes con el mayor contenido de sólidos totales en el lodo húmedo, que proporciona más sustrato lignocelulósico susceptible de degradación. En consecuencia, el lodo húmedo se confirma como la fracción más adecuada para maximizar la eficiencia de la hidrólisis enzimática y, por extensión, para la producción posterior de etanol.

El rendimiento de etanol recuperado se puede calcular mediante la siguiente ecuación:

$$\eta_i = \frac{m_{EtOH,i}}{\rho_{EtOH} V_{fermentado}} = \frac{C_i(g/L) \times V_i(L)}{\rho_{EtOH}(g/L) \times V_{fermentado}(L)} \quad (3.4)$$

## **3.4. Fermentación alcohólica**

### **3.4.1. Producción de etanol por tratamiento y condición experimental**

La fermentación alcohólica de los lodos papeleros se evaluó mediante un diseño central compuesto de tipo FCCCD, considerando como factores la temperatura (23–37 °C) y el tiempo de incubación (14–82 h). En el lodo líquido, los resultados experimentales se presentan en la Tabla 12, donde se observa que las concentraciones de etanol oscilaron entre 3.94 y 65.57 g/L, con rendimientos entre 0.0014 y 0.0320. En el lodo húmedo, los resultados se resumen en la Tabla 13, mostrando un rango más amplio de 5.58 a 74.29 g/L de etanol, con rendimientos entre 0.0017 y 0.0413

**Tabla 12.***Resultados de fermentación alcohólica en lodo líquido (FCCCD)*

| <b>Ensayo</b> | <b>Temperatura<br/>(°C)</b> | <b>Tiempo de<br/>incubación<br/>(h)</b> | <b>Tipo de<br/>punto</b> | <b>Volumen<br/>destilado (mL)</b> | <b>IR</b> | <b>Concentración<br/>etanol (g/L)</b> | <b>Rendimiento<br/>(g/L)</b> |
|---------------|-----------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|-----------|---------------------------------------|------------------------------|
| 1             | 25                          | 24                                      | Factorial                | 27.1                              | 1.3332    | 3.94                                  | 0.0014                       |
| 2             | 25                          | 48                                      | Factorial                | 28.5                              | 1.3341    | 13.47                                 | 0.0049                       |
| 3             | 25                          | 72                                      | Factorial                | 24.5                              | 1.3337    | 8.95                                  | 0.0028                       |
| 4             | 30                          | 24                                      | Factorial                | 35.9                              | 1.3349    | 22.62                                 | 0.0104                       |
| 5             | 30                          | 48                                      | Factorial                | 37.9                              | 1.3372    | 49.7                                  | 0.0241                       |
| 6             | 30                          | 72                                      | Factorial                | 36.0                              | 1.3355    | 29.57                                 | 0.0136                       |
| 7             | 35                          | 24                                      | Factorial                | 25.2                              | 1.3341    | 13.47                                 | 0.0043                       |
| 8             | 35                          | 48                                      | Factorial                | 27.2                              | 1.3345    | 18.03                                 | 0.0063                       |
| 9             | 35                          | 72                                      | Factorial                | 25.3                              | 1.3333    | 4.45                                  | 0.0014                       |
| 10            | 23                          | 48                                      | Axial                    | 34.7                              | 1.3334    | 5.58                                  | 0.0025                       |
| 11            | 37                          | 48                                      | Axial                    | 24.3                              | 1.3334    | 5.58                                  | 0.0017                       |
| 12            | 30                          | 14                                      | Axial                    | 34.6                              | 1.3336    | 7.83                                  | 0.0035                       |
| 13            | 30                          | 82                                      | Axial                    | 34.6                              | 1.3338    | 10.08                                 | 0.0045                       |
| 14            | 30                          | 48                                      | Central                  | 38.2                              | 1.3385    | 65.57                                 | 0.0320                       |
| 15            | 30                          | 48                                      | Central                  | 38.1                              | 1.3374    | 52.11                                 | 0.0254                       |
| 16            | 30                          | 48                                      | Central                  | 38.5                              | 1.3366    | 42.52                                 | 0.0210                       |

**Tabla 13.***Resultados de fermentación alcohólica en lodo húmedo (FCCCD)*

| <b>Ensayo</b> | <b>Temperatura<br/>(°C)</b> | <b>Tiempo de<br/>incubación<br/>(h)</b> | <b>Tipo de<br/>punto</b> | <b>Volumen<br/>destilado<br/>(mL)</b> | <b>IR</b> | <b>Concentración<br/>etanol (g/L)</b> | <b>Rendimiento<br/>(g/L)</b> |
|---------------|-----------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|-----------|---------------------------------------|------------------------------|
| 1             | 25                          | 24                                      | Factorial                | 30                                    | 1.3344    | 17.35                                 | 0.0046                       |
| 2             | 25                          | 48                                      | Factorial                | 32.5                                  | 1.3373    | 50.42                                 | 0.0169                       |
| 3             | 25                          | 72                                      | Factorial                | 35                                    | 1.3355    | 29.79                                 | 0.0100                       |
| 4             | 30                          | 24                                      | Factorial                | 35.5                                  | 1.3383    | 62.71                                 | 0.0135                       |
| 5             | 30                          | 48                                      | Factorial                | 40                                    | 1.3392    | 73.88                                 | 0.0352                       |
| 6             | 30                          | 72                                      | Factorial                | 42.5                                  | 1.3383    | 63.5                                  | 0.0308                       |
| 7             | 35                          | 24                                      | Factorial                | 37                                    | 1.3356    | 31.26                                 | 0.0227                       |
| 8             | 35                          | 48                                      | Factorial                | 45                                    | 1.3367    | 43.69                                 | 0.0175                       |
| 9             | 35                          | 72                                      | Factorial                | 48                                    | 1.3358    | 33.15                                 | 0.0168                       |
| 10            | 23                          | 48                                      | Axial                    | 30                                    | 1.3338    | 10.01                                 | 0.0017                       |
| 11            | 37                          | 48                                      | Axial                    | 50                                    | 1.3344    | 16.68                                 | 0.0117                       |
| 12            | 30                          | 14                                      | Axial                    | 28                                    | 1.3382    | 61.65                                 | 0.0163                       |
| 13            | 30                          | 82                                      | Axial                    | 45.5                                  | 1.3366    | 42.54                                 | 0.0287                       |
| 14            | 30                          | 48                                      | Central                  | 44                                    | 1.3387    | 67.5                                  | 0.0355                       |
| 15            | 30                          | 48                                      | Central                  | 43                                    | 1.3388    | 69.42                                 | 0.0357                       |
| 16            | 30                          | 48                                      | Central                  | 46                                    | 1.3381    | 60.6                                  | 0.0413                       |

Los datos confirman que las condiciones centrales (30 °C, 48 h) favorecieron la mayor producción de etanol en ambos casos, lo que concuerda con estudios previos sobre fermentación en residuos lignocelulósicos.

### ***3.4.2. Producción de etanol en lodo húmedo y líquido (FCCCD)***

El análisis comparativo entre ambas fracciones evidencia que el lodo húmedo mostró una producción más elevada y estable que el lodo líquido. En condiciones centrales, el rendimiento máximo se alcanzó en el ensayo 16 del lodo húmedo (74.29 g/L, 0.0413 de rendimiento), mientras que en el lodo líquido correspondió al ensayo 14 (65.57 g/L, 0.0320 de rendimiento).

La mayor fracción de sólidos totales en el lodo húmedo (24.19 %) explica la disponibilidad adicional de carbohidratos fermentables, que favoreció la síntesis de etanol. En contraste, el lodo líquido, con 1.44 % de sólidos, limitó la concentración final alcanzada.

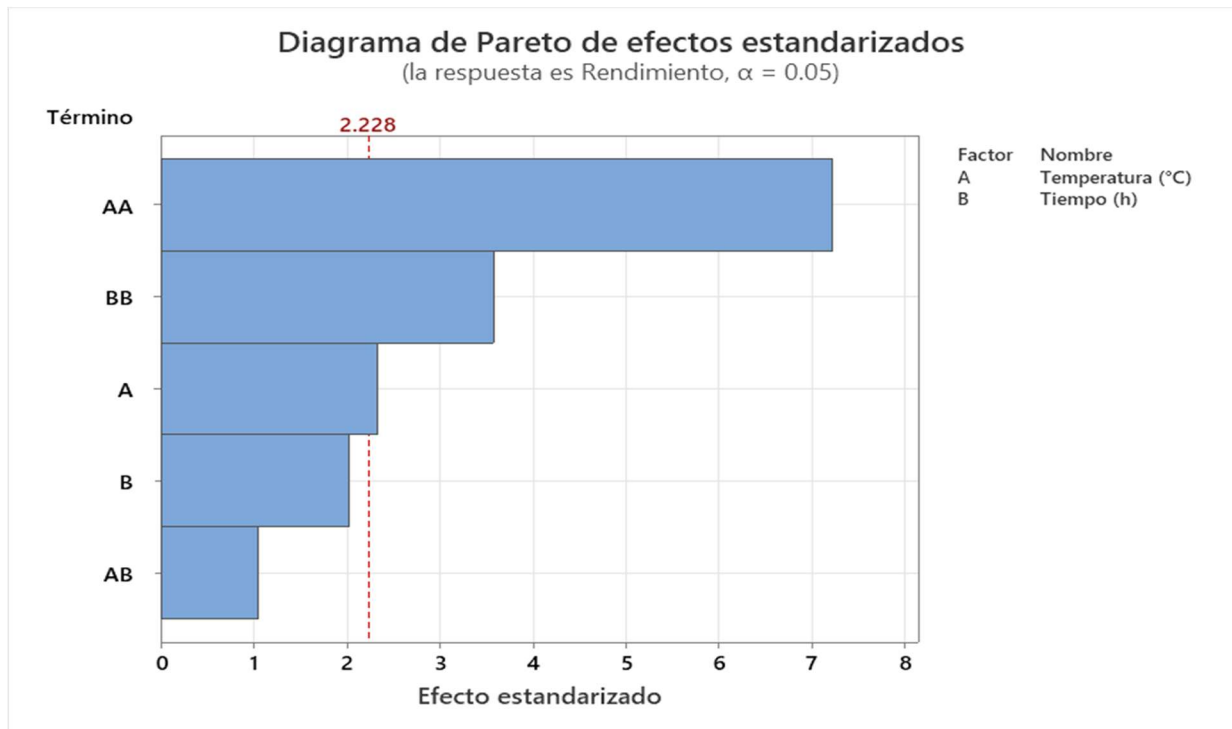
### ***3.4.3. Análisis estadístico RSM y modelos de superficie de respuesta***

El análisis de superficie de respuesta (RSM) permitió evaluar la influencia de la temperatura y el tiempo de incubación sobre el rendimiento alcohólico.

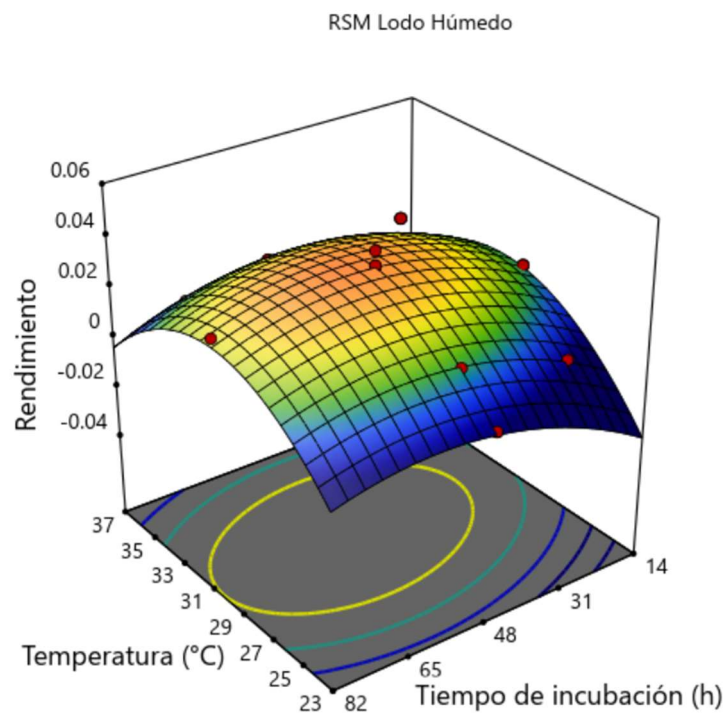
En el lodo húmedo, el modelo resultó altamente significativo ( $p < 0.001$ ), con un  $R^2 = 86.73 \%$ ,  $R^2$  ajustado =  $80.09 \%$  y un  $R^2$  de predicción =  $64.41 \%$ , lo que indica un buen ajuste general, pero con variabilidad experimental moderada. El diagrama de Pareto (Figura 6) mostró que los términos cuadráticos de temperatura<sup>2</sup> y tiempo<sup>2</sup> fueron los factores más influyentes, mientras que los términos lineales y la interacción no fueron significativos. La superficie de respuesta (Figura 7) evidenció una curvatura parabólica, con una zona óptima en torno a 30 °C y 48 h.

**Figura 6.**

*Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para lodo húmedo*

**Figura 7.**

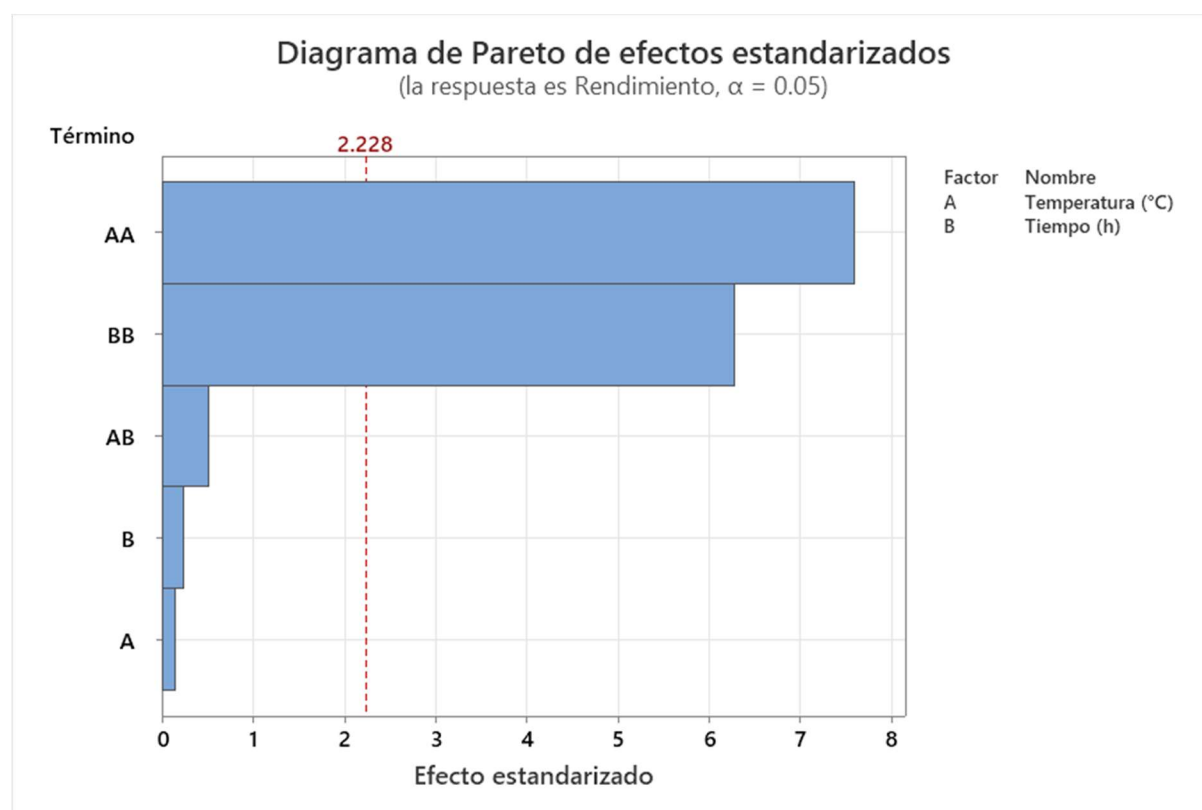
*Superficie de respuesta del rendimiento de etanol en función de temperatura y tiempo en lodo húmedo*



En el lodo líquido, el modelo también fue significativo ( $p < 0.001$ ), con un  $R^2 = 88.41$  %,  $R^2$  ajustado = 82.62 % y un  $R^2$  de predicción = 78.46 %, lo que refleja un mejor poder predictivo respecto al lodo húmedo. La prueba de falta de ajuste no fue significativa ( $p = 0.669$ ), confirmando la robustez del modelo. El diagrama de Pareto (Figura 8) indicó nuevamente que los términos cuadráticos de temperatura<sup>2</sup> y tiempo<sup>2</sup> fueron los factores relevantes, mientras que la interacción no tuvo significancia estadística. La superficie de respuesta (Figura 9) mostró un máximo de rendimiento en torno a 30 °C y entre 48–55 h.

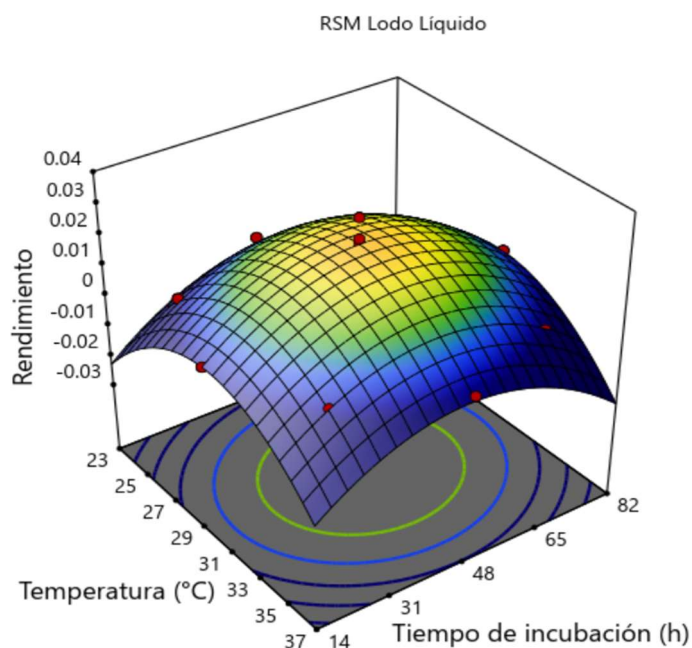
**Figura 8.**

*Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para lodo líquido*



**Figura 9.**

*Superficie de respuesta del rendimiento de etanol en función de temperatura y tiempo en lodo líquido*



### 3.4.4. Interpretación de condiciones óptimas

Los modelos ajustados permiten establecer las condiciones que maximizan la producción de etanol en ambos sustratos.

En el lodo húmedo, el modelo obtenido fue:

$$R = -0.5903 + 0.03738T + 0.002046t - 0.0005909T^2 - 0.00001250t^2 - 0.00002347Tt$$

donde T corresponde a la temperatura (°C) y t al tiempo de incubación (h). Este modelo predice un rendimiento máximo cercano a 74.29 g/L en torno a 30 °C y 48 h, lo cual coincide con los resultados experimentales. A temperaturas extremas (23–37 °C) o tiempos prolongados (82 h), la producción disminuyó por inhibición metabólica de la levadura.

En el lodo líquido, el modelo ajustado fue:

$$R = -0.4680 + 0.02963T + 0.001931t - 0.0004860T^2 - 0.00001716t^2 - 0.00000907Tt$$

Este modelo estimó condiciones óptimas cercanas a 30 °C y 48–55 h, con un rendimiento máximo de 65.57 g/L. Aunque este valor es inferior al del lodo húmedo, la

mayor homogeneidad de la matriz líquida redujo la variabilidad experimental, lo que representa una ventaja en términos de reproducibilidad.

### 3.5. Verificación del etanol obtenido

#### 3.5.1. Determinación de densidad del destilado

La densidad de los destilados se determinó mediante picnómetro calibrado a 25 °C.

La Tabla 14 muestra los resultados obtenidos para los destilados provenientes de lodo húmedo y lodo líquido.

**Tabla 14.**

*Determinación de densidad del destilado mediante picnómetro lodo húmedo y líquido*

|                                           | Destilado de lodo húmedo |         | Destilado de lodo líquido |         |
|-------------------------------------------|--------------------------|---------|---------------------------|---------|
| Masa picnómetro vacío (g)                 | 11.8350                  | 11.8351 | 11.8350                   | 11.8351 |
| Masa picnómetro<br>+destilado (g)         | 21.4264                  | 21.4264 | 22.5916                   | 22.5804 |
| Volumen del picnómetro<br>(mL)            | 10.8508                  |         | 10.8508                   |         |
| Densidad del destilado<br>(g/mL)          | 0.8839                   | 0.8839  | 0.9913                    | 0.9903  |
| Densidad del destilado<br>promedio (g/mL) | 0.8840                   |         | 0.9908                    |         |
| Porcentaje de error (%)                   | 12.0375                  |         | 25.5770                   |         |

Se observa que ambos destilados presentaron densidades superiores al valor de referencia del etanol puro (0.789 g/mL). El destilado del lodo húmedo alcanzó un valor promedio de 0.884 g/mL (error 12 %), mientras que el del lodo líquido fue de 0.991 g/mL (error 25 %). Estos valores indican la presencia de impurezas y agua residual, siendo el lodo líquido el que mostró mayor desviación respecto al estándar. En términos comparativos, el

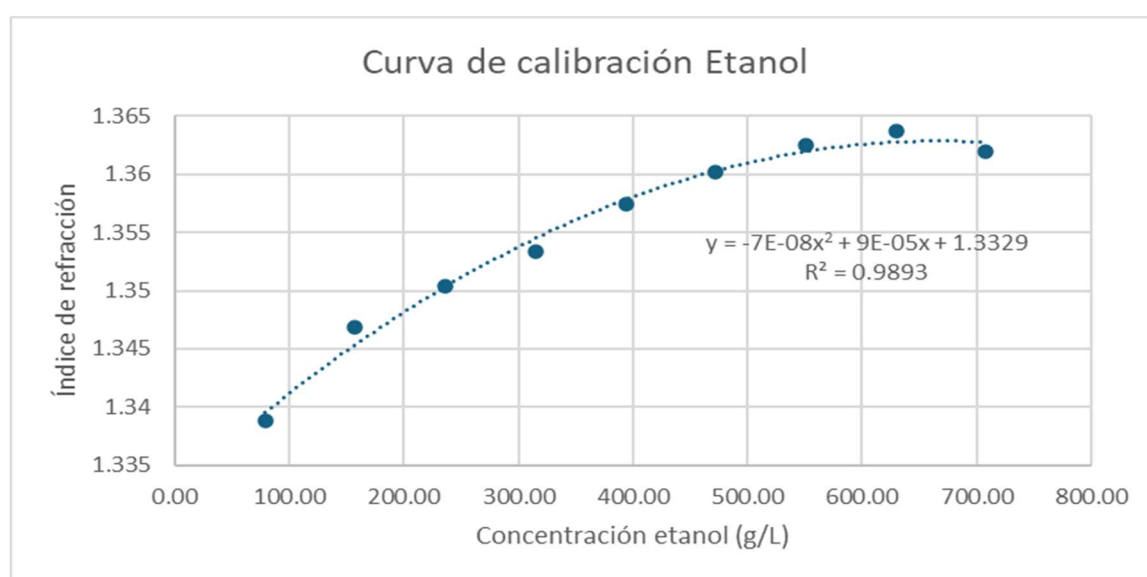
lodo húmedo produjo un destilado más cercano al valor de referencia, lo que sugiere una menor contaminación con compuestos no etanólicos.

### 3.5.2. Curva de calibración de etanol

La verificación del etanol obtenido requirió establecer una relación entre el índice de refracción (IR) y la concentración de etanol en solución acuosa. La curva de calibración se construyó a partir de soluciones estándar presentadas en la Figura 10.

**Figura 10.**

*Curva de calibración de etanol mediante índice de refracción*



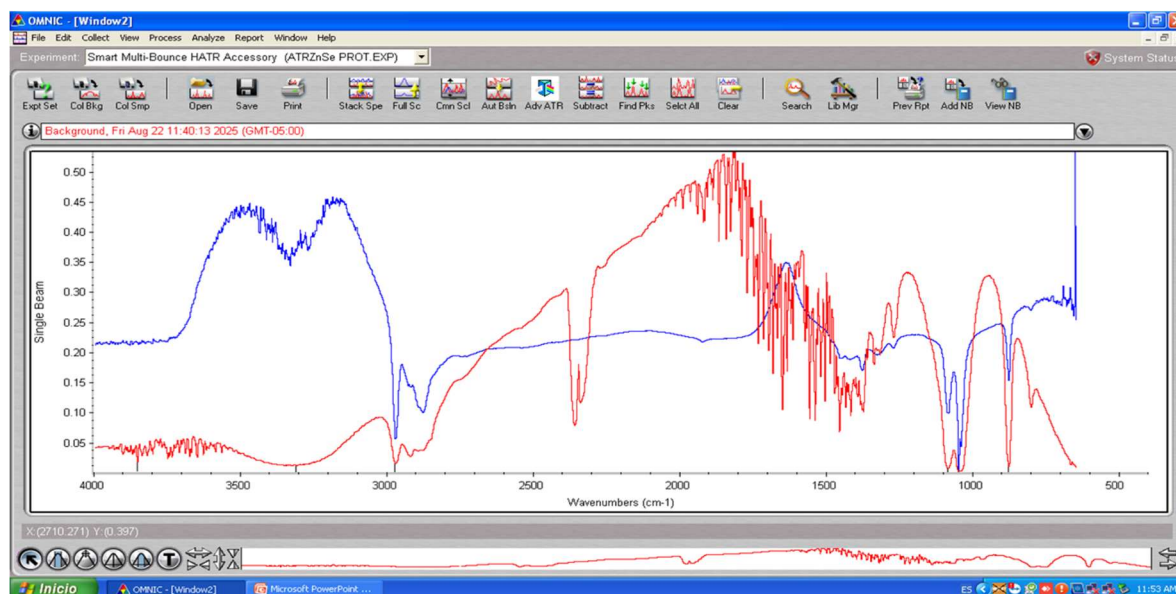
El análisis evidenció un incremento progresivo del IR conforme aumentó la concentración de etanol hasta 629.50 g/L, con un punto máximo en 708.18 g/L. Esta curva permitió validar que los valores de IR medidos en los destilados se correspondían efectivamente con la presencia de etanol, aunque los desvíos observados respecto al comportamiento teórico reflejan la influencia de mezclas con agua y compuestos secundarios.

### 3.5.3. Análisis FTIR del destilado

El análisis FTIR permitió confirmar la identidad química del etanol presente en los destilados. En la Figura 11 se presentan los espectros comparativos del destilado y del etanol estándar.

**Figura 11.**

*Espectros FTIR del destilado (azul) y etanol estándar (rojo)*



Los espectros mostraron bandas características de etanol:

- $3300\text{ cm}^{-1}$ : vibración de estiramiento O–H.
- $2970\text{ cm}^{-1}$ : estiramiento C–H de grupos metilo y metileno.
- $1050\text{ cm}^{-1}$ : vibración de enlace C–O, confirmando que la estructura molecular del etanol se mantuvo tras la destilación.

Adicionalmente, en los destilados se observaron picos alrededor de  $1600\text{ cm}^{-1}$ , asociados a compuestos secundarios como ácido acético y acetaldehído, y señales menores en la región  $<800\text{ cm}^{-1}$ , atribuibles a impurezas inorgánicas o residuos no volátiles.

En conjunto, el FTIR valida la presencia de etanol en el destilado, aunque acompañado de subproductos propios de la fermentación alcohólica. Por ello, no se puede afirmar que el etanol fue el componente predominante, sino que coexistió con compuestos secundarios que explican las desviaciones detectadas en la densidad.

### 3.6. Evaluación económica preliminar del proceso

#### 3.6.1. Consumo de reactivos

El consumo de reactivos se calculó a partir de las cantidades utilizadas en los ensayos de hidrólisis, fermentación y destilación, diferenciando entre lodo líquido y lodo húmedo.

En el lodo líquido (Tabla 15), el costo total de los reactivos fue de 199.18 USD, siendo el agua destilada el insumo más representativo (121.12 USD), debido al elevado volumen requerido. Otros insumos, como el hidróxido de sodio (6.37 USD) y el tartrato de sodio y potasio (9.25 USD), tuvieron una participación menor.

**Tabla 15.**

*Consumo de reactivos – Lodo líquido*

| Reactivo                         | Precio unitario<br>(USD) | Cantidad total<br>consumida | Costo (USD) |
|----------------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------|
| Ácido sulfúrico (L)              | 28.00                    | 0.15173 L                   | 4.25        |
| Agua destilada (L)               | 2.00                     | 60.56 L                     | 121.12      |
| Buffer fosfato (L)               | 55.00                    | 0.4000 L                    | 22.00       |
| DNS (kg)                         | 115.37                   | 0.0040 kg                   | 0.46        |
| Enzima celulasa (kg)             | 167.60                   | 0.0064 kg                   | 1.07        |
| Fenol (L)                        | 297.95                   | 0.1158 L                    | 34.49       |
| Glucosa (kg)                     | 5.75                     | 0.0128 kg                   | 0.07        |
| Hidróxido de sodio (kg)          | 31.15                    | 0.2045 kg                   | 6.37        |
| Levadura (kg)                    | 2.40                     | 0.0080 kg                   | 0.02        |
| Sulfito de sodio (kg)            | 33.00                    | 0.0020 kg                   | 0.07        |
| Tartrato de sodio y potasio (kg) | 77.09                    | 0.1200 kg                   | 9.25        |
| <b>Total</b>                     |                          |                             | 199.18      |

En el lodo húmedo (Tabla 16), el costo total ascendió a 52.41 USD, dado que se utilizaron volúmenes menores de agua destilada (47.42 USD prorrateados en la escala experimental) y cantidades muy reducidas del resto de reactivos. La enzima celulasa, a pesar

de tener un precio unitario elevado (167.6 USD/kg), representó un costo bajo por la mínima dosis utilizada (1.67 USD).

**Tabla 16.**

*Consumo de reactivos – Lodo húmedo*

| <b>Reactivo</b>            | <b>Precio unitario<br/>(USD)</b> | <b>Cantidad total<br/>consumida</b> | <b>Costo (USD)</b> |
|----------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------|
| Ácido cítrico anhidro (kg) | 28.90                            | 0.00457 kg                          | 0.13               |
| Ácido sulfúrico (L)        | 28.00                            | 0.01224 L                           | 0.34               |
| Agua destilada (L)         | 2.00                             | 23.71 L                             | 47.42              |
| Citrato de sodio (kg)      | 5.75                             | 0.00673 kg                          | 0.05               |
| Enzima celulasa (kg)       | 167.60                           | 0.0100 kg                           | 1.68               |
| Glucosa (kg)               | 5.75                             | 0.0128 kg                           | 0.07               |
| Hidróxido de sodio (kg)    | 31.15                            | 0.0870 kg                           | 2.71               |
| Levadura (kg)              | 2.40                             | 0.0080 kg                           | 0.02               |
| <b>Total</b>               |                                  |                                     | 52.41              |

En ambos casos, el insumo de mayor impacto económico fue el agua destilada, debido al elevado volumen requerido en los tratamientos. Asimismo, la enzima celulasa representó un costo relevante por su precio unitario, aunque su contribución al total fue baja al usarse en pequeñas cantidades.

### **3.6.2. Consumo energético**

El gasto energético se estimó en función de la potencia nominal de los equipos empleados y el tiempo de operación durante cada etapa del proceso. Los resultados se presentan en las Tablas 24 (lodo líquido) y Tabla 25 (lodo húmedo) Apéndice A.

Los equipos con mayor consumo fueron la plancha calefactora y la incubadora, debido a los prolongados tiempos requeridos para mantener las condiciones de calentamiento y fermentación. Por ejemplo, la incubadora representó más del 40 % del gasto energético

total en ambos casos. En contraste, el autoclave, espectrofotómetro y bomba de vacío tuvieron consumos menores, aportando menos del 10 % al total.

De esta manera, el perfil energético muestra que la fermentación y el mantenimiento de temperatura constituyen las etapas más demandantes del proceso, lo que impacta de forma directa en el costo total de producción.

### ***3.6.3. Estimación de costos de laboratorio***

La integración de los costos de reactivos y energía permitió calcular el costo total de producción a nivel de laboratorio. Para el lodo líquido, el costo total obtenido fue de 199.18 USD en reactivos y 80.64 USD en energía, lo que da un costo total de producción de 279.82 USD. Este valor corresponde a una producción de 0.44 L de etanol destilado, lo que implica un costo unitario de aproximadamente 636.9 USD/L.

Por otro lado, para el lodo húmedo, el costo total obtenido fue de 52.41 USD en reactivos y 84.27 USD en energía, sumando un costo total de producción de 136.68 USD. Este valor corresponde a una producción de 0.0377 L de etanol destilado, lo que equivale a un costo unitario de aproximadamente 3676 USD/L.

Estos resultados reflejan que, bajo condiciones de laboratorio, el proceso no es económicamente competitivo, ya que el rendimiento volumétrico es bajo y el consumo energético es elevado en relación con la cantidad de producto final. La estimación se realizó considerando únicamente el etanol purificado tras la destilación, excluyendo pérdidas y subproductos.

### ***3.6.4. Proyección de costos a escala mayor***

Con el fin de evaluar la factibilidad en condiciones más cercanas a un esquema industrial, se elaboró una proyección de costos considerando una producción estimada de 10 L de etanol (escala piloto). Los resultados se presentan en la Tabla 17.

**Tabla 17.***Proyección de Costo de Producción a Escala Mayor*

| <b>Descripción</b>                        | <b>Valor (USD)</b> |
|-------------------------------------------|--------------------|
| Costo Total de Reactivos (Escala Mayor)   | 41.93              |
| Costo Total de Energía (Escala Mayor)     | 71.63              |
| Costo Total de Producción (Escala Mayor)  | 113.56             |
| Etanol Producido (Escala Mayor, L)        | 10                 |
| Costo por L de Etanol (USD/L, Proyectado) | 11.36              |

En este escenario, el costo total de producción se redujo a 113.56 USD, lo que representa un costo unitario de 11.36 USD/L, valor significativamente inferior al obtenido en condiciones de laboratorio. La reducción se explica por:

Compra a granel de reactivos, que disminuye el costo unitario de insumos como el agua destilada y los ácidos.

Mayor eficiencia energética de equipos de escala piloto, donde el costo por kWh se distribuye en un volumen superior de producción.

La proyección a escala mayor evidencia que el proceso de obtención de bioetanol a partir de lodos papeleros puede volverse económicamente más viable si se optimizan volúmenes y condiciones de operación, disminuyendo el costo por litro en más de un 95 % respecto al nivel de laboratorio.

### **3.7. Discusión general de resultados**

#### ***3.7.1. Relación entre condiciones iniciales y rendimiento de etanol***

Los resultados experimentales mostraron una relación directa entre la composición inicial de los lodos papeleros y el rendimiento obtenido en la fermentación alcohólica. El lodo húmedo, con un mayor contenido de sólidos totales (24.19 %) y concentraciones más elevadas de carbohidratos y azúcares reductores (3.85 g/L tras hidrólisis), alcanzó valores máximos de 74.29 g/L de etanol en condiciones óptimas (30 °C, 48 h). En contraste, el lodo

líquido, caracterizado por una humedad elevada (98.56 %) y menor disponibilidad de carbohidratos (3.32 g/L), presentó rendimientos inferiores, con un máximo de 65.57 g/L.

Este comportamiento confirma que la cantidad de materia orgánica fermentable disponible en el sustrato es el factor crítico en la eficiencia del proceso. A ello se suma la actividad enzimática obtenida durante la hidrólisis (hasta 1740 U/g en diluciones concentradas), que evidenció una alta capacidad de conversión de celulosa a azúcares fermentables y contribuyó directamente a los rendimientos observados en fermentación.

No obstante, la calidad del bioetanol obtenido se vio afectada por la presencia de impurezas detectadas en los destilados, con densidades superiores al valor de referencia para etanol puro (0.789 g/mL). El lodo húmedo mostró desviaciones menores (0.884 g/mL, error 12 %), mientras que el lodo líquido presentó mayor desviación (0.991 g/mL, error 25 %). El análisis FTIR confirmó la presencia de etanol, pero también de subproductos secundarios como ácido acético y acetaldehído, lo que explica las diferencias observadas en pureza.

En conjunto, los resultados demuestran que la composición inicial del lodo determina la magnitud de azúcares liberados, la eficiencia de fermentación y la calidad del destilado, resaltando la importancia de seleccionar adecuadamente el tipo de lodo y optimizar los pretratamientos en futuras aplicaciones a escala piloto.

### **3.7.2. Comparación con estudios previos**

La producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos ha sido ampliamente estudiada, reportándose rendimientos variables según el sustrato y las condiciones aplicadas. Investigaciones con bagazo de caña y aserrín señalan concentraciones de 40–60 g/L de etanol bajo condiciones de fermentación comparables (Benavides, 2020; Hosam, 2024). Los valores máximos alcanzados en este estudio (65.57–74.29 g/L) superan dichos rangos, lo que confirma que los lodos papeleros constituyen un sustrato competitivo dentro del grupo de residuos lignocelulósicos aprovechables.

En el contexto nacional, la valorización de lodos papeleros se ha orientado principalmente hacia usos no energéticos, como su incorporación en materiales de construcción o compostaje. Este trabajo representa uno de los primeros aportes experimentales en Ecuador en torno a la conversión biotecnológica de lodos papeleros en biocombustibles, ampliando el espectro de alternativas para la gestión de este residuo.

Si bien los rendimientos obtenidos fueron elevados, la presencia de subproductos en los destilados y las desviaciones respecto al valor de referencia de etanol puro evidencian la necesidad de etapas adicionales de purificación (ej. rectificación, destilación fraccionada, uso de membranas selectivas) para alcanzar los estándares internacionales de bioetanol carburante. A pesar de ello, los resultados confirman que la ruta propuesta es técnica y económicamente viable en escenarios de escalamiento controlado, y se posiciona como una alternativa prometedora frente a la disposición convencional de estos residuos en rellenos sanitarios.

## Capítulo 4

## 4. Conclusiones y Recomendaciones

### 4.1. Conclusiones

- La producción de bioetanol a partir de lodos papeleros se comprobó técnicamente viable bajo condiciones de laboratorio. El lodo húmedo, gracias a su mayor proporción de sólidos y carbohidratos, alcanzó los rendimientos más altos de etanol (0.0413 frente a 0.0320 en lodo líquido), mientras que el lodo líquido destacó por su mayor estabilidad experimental. Los análisis de densidad, índice de refracción y FTIR confirmaron la presencia de etanol en los destilados, aunque se observaron desviaciones respecto al valor teórico (0.884 g/mL en lodo húmedo y 0.990 g/mL en lodo líquido frente a 0.789 g/mL teórico) y la formación de subproductos como acetaldehído y ácido acético. Esto evidencia que, aunque la fermentación fue exitosa, se requieren etapas adicionales de purificación para cumplir con los estándares de bioetanol carburante.
- El efecto de la temperatura y el tiempo de incubación fue determinante en la producción de etanol. Las condiciones óptimas se ubicaron en torno a 30 °C y 48 h, alcanzándose 74.29 g/L en el lodo húmedo y 65.57 g/L en el lodo líquido. Esto demuestra que, aunque ambos lodos son aprovechables, el lodo húmedo ofrece mayor productividad debido a su mayor disponibilidad de carbohidratos tras la hidrólisis enzimática.
- El diseño de superficie de respuesta (FCCCD) permitió identificar un comportamiento parabólico, donde las condiciones intermedias resultaron más favorables. El modelo del lodo húmedo mostró un ajuste adecuado ( $R^2 = 86.73 \%$ ,  $R^2$  ajustado = 80.19 %,  $R^2$  pred = 64.41 %), o que indica buen ajuste general, aunque con menor capacidad predictiva. En contraste, el modelo del lodo líquido

presentó un mejor desempeño ( $R^2 = 88.41 \%$ ,  $R^2$  ajustado =  $82.62 \%$ ,  $R^2$  pred =  $78.46 \%$ ), evidenciando un ajuste aceptable y con mayor robustez comparativa.

- El análisis económico preliminar evidenció que, el proceso no es técnicamente factible a nivel de laboratorio, presenta limitaciones económicas debido al alto consumo de reactivos y a la baja pureza del etanol obtenido, lo que restringe su aplicación directa como biocombustible. No obstante, los resultados constituyen una base sólida para futuros estudios de viabilidad a escala piloto e industrial, orientados a optimizar costos y mejorar la eficiencia en la valorización de residuos papeleros.

## 4.2. Recomendaciones

- Se recomienda utilizar técnicas analíticas más confiables para la cuantificación de etanol (ej. cromatografía de gases o HPLC), a fin de reducir la variabilidad asociada al uso de métodos indirectos como el índice de refracción.
- Evaluar métodos de pretratamiento combinados (físico-químico, mecánico o con ozono) que permitan incrementar la liberación de carbohidratos en el lodo líquido y reducir el arrastre de impurezas en el destilado.
- Es necesario implementar técnicas de rectificación, destilación fraccionada o membranas selectivas para eliminar compuestos secundarios (ej. acetaldehído, ácidos orgánicos) detectados por FTIR y obtener un bioetanol de grado carburante.
- Se recomienda realizar pruebas piloto en reactores de mayor capacidad (5–10 L) para verificar la reproducibilidad de los modelos estadísticos y evaluar la eficiencia de fermentación a nivel semi-industrial.

## Bibliografía

- Fernández Bao, S. (Julio de 2020). *Diseño Experimental*. Universidad Politécnica de Catalunya:  
[https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/339723/TFM\\_Fernandez\\_Bao\\_Sh\\_eila.pdf](https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/339723/TFM_Fernandez_Bao_Sh_eila.pdf)
- Abril Guamancela, D. V. (2 de Marzo de 2021). *Evaluación de la utilización de los lodos residuales de la industria papelera en la fabricación de hormigón*. Universidad de Cuenca: <https://dspace-test.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/35711>
- Alvarado, G. (2021). *Obtención de Bioetanol a partir del bagazo de la caña de azúcar mediante hidrólisis enzimática*. Universidad Politécnica Salesiana: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/21229/1/UPS-CT009334.pdf>
- Ayala, D. (2024). *Energías renovables: energías para un futuro más seguro*. Revista Digital Facultad de Ciencias Administrativas y Recursos Humanos: [https://www.administracion.usmp.edu.pe/revista-digital-usmp/entrada\\_7/equilibrando-las-tendencias-globales-energia-poblacion-y-recursos-para-un-futuro-sostenible/](https://www.administracion.usmp.edu.pe/revista-digital-usmp/entrada_7/equilibrando-las-tendencias-globales-energia-poblacion-y-recursos-para-un-futuro-sostenible/)
- Bang, D., & Yuyin, W. (2025). *Ethanol metabolism in anaerobic digestion systems for better renewable energy recovery from waste feedstocks*. Elsevier: <https://pdf.sciencedirectassets.com/271433/1-s2.0-S0960852425X20162/1-s2.0-S0960852425008284/main.pdf?X-Amz-Security-Token=IQoJb3JpZ2luX2VjEDYaCXVzLWVhc3QtMSJIMEYCIQCnExKFkScSI3IkpOMdRDo7KKVTNuZ1MwOLt4UTM5Zgo%2FAIhAJgoTwlClfAZXdHqiyIzhQyJrGqggtR2vMqbwpAhCh>
- Benavides, M. A. (2020). *Aplicación de la fermentación láctica como estrategia de transformación y valorización de matrices vegetales*. Universidad Politécnica de Catalunya: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/669678/TMABM1de1.pdf;jsessionid=02DF444CF9C1035FCF5BE0491E93C041?sequence=2>
- Bioresource. (2023). *Bioresource Technology*. Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/journal/bioresource-technology>
- Chuya, G., & Mancheno, D. (2024). *Diseño del proceso para producción de bioetanol a partir de lodos*. Escuela Superior Politécnica del Litoral.

- Espinoza, A. (31 de May de 2023). *Circular economy: an approach to its origin, evolution and importance as a model of sustainable development*. Universidad Externado de Colombia: <https://www.redalyc.org/journal/419/41977102006/html/>
- García, M. I. (2020). *Tratamiento de lodos residuales procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales mediante procesos electroquímicos para la disminución de la concentración de coliformes fecales y totales*. Universidad Politécnica Salesiana: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12044/1/UPS-CT005866.pdf>
- Ghose, T. K. (1987). *Measurement of cellulase activities*. Pure and Applied Chemistry: <https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1351/pac198759020257/html>
- Guevara, A. (2020). *Obtención de Extractos Enzimáticos con Actividad Celulotica Mediante Fermentación del Hongo Trichoderma reesei Sobre Celulosa y Posible Aplicación en el BIO-PULPEO de Envases Multicapa*. Escuela Politécnica Nacional: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/20818/1/CD%2010340.pdf>
- Guindal, A. (2024). *Estrategias de uso de Saccharomyces cerevisiae en fermentaciones aeróbicas*. Universidad de la Rioja: [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewjaw8CDnoqOAxX7TTABHQIBHjwQFnoECB0QAQ&url=https%3A%2F%2Fdigitalnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Ftesis%2F325327.pdf&usg=AOvVaw0DP5jIH\\_X8miyDtsvsla\\_v&opi=89978449](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewjaw8CDnoqOAxX7TTABHQIBHjwQFnoECB0QAQ&url=https%3A%2F%2Fdigitalnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Ftesis%2F325327.pdf&usg=AOvVaw0DP5jIH_X8miyDtsvsla_v&opi=89978449)
- Hernández, D. J. (2020). *Trichoderma: AGRICULTURAL AND BIOTECHNOLOGICAL IMPORTANCE, AND FERMENTATION SYSTEMS FOR PRODUCING BIOMASS AND ENZYMES OF INDUSTRIAL INTEREST*. Scielo Chile: [https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0719-38902019005000205&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0719-38902019005000205&script=sci_arttext)
- Hosam, E. (2024). *Expanding the Horizons of Saccharomyces cerevisiae: Nutrition, Oenology, and Bioethanol Production*. MDPI: La temperatura es una de las variables más sensibles en procesos fermentativos. Afecta directamente la velocidad de crecimiento de las levaduras, la actividad de sus enzimas intracelulares y la producción de etanol.
- IEA. (2023). *World Energy*. International Energy Agency: <https://www.iea.org/reports/world-energy-outlook-2023>
- Lesaffre. (13 de May de 2020). *Who is Saccharomyces cerevisiae, the star of the yeast world?* <https://www.lesaffre.com/trends-mag/introducing-yeast-saccharomyces-cerevisiae/>
- Loayza, K. (2020). *Determinación de las condiciones Optimas de Fermentación para la obtencion de Bioetanol a partir del Hidrolizado Acido de la Corteza del Cacao. Proveniente de la Industria Cacaotera del Ecuador*. Universidad Politécnica Salesiana.

- Manzano Mantilla , M. J. (2023). *Situación actual del sector eléctrico ecuatoriano y sus desafíos*. Universidad Andina Simón Bolívar : <https://repositorio.uasb.edu.ec/bitstream/10644/9043/1/T3958-MRI-Manzano-Situacion.pdf>
- Muhammad, M., & Fraceto, L. (20 de May de 2023). *Lignocellulosic biomass from agricultural waste to the circular economy: a review with focus on biofuels, biocomposites and bioplastics*. ScienceDirect: La biomasa lignocelulósica puede obtenerse a partir de diversas fuentes naturales y residuos generados por actividades humanas
- NIH. (2021). *Potencia de energia renovable*. National Institutes of Health: [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewisnv3flIqOAxVsRDABHXtpBW8QFnoECB0QAQ&url=https%3A%2F%2Fpmc.ncbi.nlm.nih.gov%2Farticles%2FPMC11013350%2F&usg=AOvVaw2BFYC\\_RWRFzUILH9rV2u1T&opi=89978449](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewisnv3flIqOAxVsRDABHXtpBW8QFnoECB0QAQ&url=https%3A%2F%2Fpmc.ncbi.nlm.nih.gov%2Farticles%2FPMC11013350%2F&usg=AOvVaw2BFYC_RWRFzUILH9rV2u1T&opi=89978449)
- Parapouli, M. (2020). *Saccharomyces cerevisiae and its industrial applications*. ResearchGate: [https://www.researchgate.net/publication/339172868\\_Saccharomyces\\_cerevisiae\\_and\\_its\\_industrial\\_applications](https://www.researchgate.net/publication/339172868_Saccharomyces_cerevisiae_and_its_industrial_applications)
- Perez, M. (2016). *Tratamiento de Lodos Residuales Procedentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Mediante Procesos Electroquímicos para la Dismutación de Metales Pesados (PB)*. Universidad Politécnica Salesiana: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12045/1/UPS-CT005868.pdf>
- Piñeros, Y. (2020). *Aprovechamiento de biomasa lignocelulósica, algunas experiencias de investigación en Colombia*. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano: [https://www.researchgate.net/profile/Yineth-Pineros-Castro/publication/279448880\\_Aprovechamiento\\_de\\_biomasa\\_lignocelulosica\\_algunas\\_experiencias\\_de\\_investigacion\\_en\\_Colombia/links/5728c00608aef5d48d2c8661/Aprovechamiento-de-biomasa-lignocelulosica-algunas](https://www.researchgate.net/profile/Yineth-Pineros-Castro/publication/279448880_Aprovechamiento_de_biomasa_lignocelulosica_algunas_experiencias_de_investigacion_en_Colombia/links/5728c00608aef5d48d2c8661/Aprovechamiento-de-biomasa-lignocelulosica-algunas)
- Raudales, E. V. (2024). *Circular economy: a systematic and bibliometric review*. Dialnet: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewjs0KCqmoqOAxXIQzABHfpEANwQFnoECBkQAQ&url=https%3A%2F%2Fdialnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F9839660.pdf&usg=AOvVaw1eO-tT3kzLLIrpDJIwc-sP&opi=89978449>
- Repsol. (2024). *Economía circular*. <https://www.repsol.com/es/sostenibilidad/ejes-sostenibilidad/medio-ambiente/economia-circular/index.cshtml>

- Seiboth, B. (2020). *Trichoderma reesei: A Fungal Enzyme Producer for Cellulosic Biofuels*. ResearchGate:  
[https://www.researchgate.net/publication/221916722\\_Trichoderma\\_reesei\\_A\\_Fungal\\_Enzyme\\_Producer\\_for\\_Cellulosic\\_Biofuels](https://www.researchgate.net/publication/221916722_Trichoderma_reesei_A_Fungal_Enzyme_Producer_for_Cellulosic_Biofuels)
- Spectra. (21 de May de 2024). *Comparative Study Biofuels and Conventional Fuel: Analysing the Engine Performance*. Spectra Fuels: <https://www.spectrafuels.com/comparative-study-biofuels-and-conventional-fuel-analysing-the-engine-performance/>
- Sunil, M., & Kalyan, G. (2021). *Sustainable Processing of Biomass for Hydrocarbon Biofuels*. Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128233061/hydrocarbon-biorefinery>
- UE. (27 de Agosto de 2024). *Energía biomasa: qué es, tipos y ejemplos*. Universidad Europea: <https://universidadeuropea.com/blog/tipos-biomasa/>
- UI. (2021). *Fermentación alcohólica*. Universidad Icesi: [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewi6r9uTnIqOAxU0TTABHcypBcEQFnoECBsQAQ&url=https%3A%2F%2Fbanner9.icesi.edu.co%2Fic\\_contenidos\\_pdf%2Fadjuntos%2F202210%2F202210\\_11047\\_13052.pdf&usg=AOvVaw0jdA\\_LQe3-e24iy8FrAtne&opi=899](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewi6r9uTnIqOAxU0TTABHcypBcEQFnoECBsQAQ&url=https%3A%2F%2Fbanner9.icesi.edu.co%2Fic_contenidos_pdf%2Fadjuntos%2F202210%2F202210_11047_13052.pdf&usg=AOvVaw0jdA_LQe3-e24iy8FrAtne&opi=899)
- UTPL. (1 de Octubre de 2024). *Valorización de residuos: una oportunidad para la sostenibilidad ambiental*. Cultura Científica UTPL: <https://culturacientifica.utpl.edu.ec/valorizacion-de-residuos-una-oportunidad-para-la-sostenibilidad-ambiental/>

## Apéndice A

**Tabla 18.**

*Valores de absorbancia y concentración para la curva de calibración de glucosa*

| <b>Absorbancia<br/>(1)</b> | <b>Absorbancia (2)</b> | <b>Absorbancia<br/>(Promedio)</b> | <b>Concentración<br/>(g/L)</b> |
|----------------------------|------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| 0.211                      | 0.213                  | 0.212                             | 0.01                           |
| 0.495                      | 0.532                  | 0.5135                            | 0.03                           |
| 0.959                      | 0.875                  | 0.917                             | 0.05                           |
| 1.196                      | 1.279                  | 1.2375                            | 0.06                           |
| 1.288                      | 1.477                  | 1.3825                            | 0.07                           |
| 2.166                      | 2.029                  | 2.0975                            | 0.1                            |

**Tabla 19.**

*Datos de la curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores*

| <b>Absorbancia (1)</b> | <b>Absorbancia (2)</b> | <b>Absorbancia (Promedio)</b> | <b>Concentración<br/>(g/L)</b> |
|------------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 0.029                  | 0.033                  | 0.031                         | 0.3                            |
| 0.134                  | 0.127                  | 0.131                         | 0.5                            |
| 0.214                  | 0.209                  | 0.212                         | 0.7                            |
| 0.41                   | 0.423                  | 0.417                         | 1                              |
| 0.533                  | 0.505                  | 0.519                         | 1.3                            |
| 0.768                  | 0.729                  | 0.749                         | 1.7                            |
| 0.845                  | 0.881                  | 0.863                         | 2                              |

**Tabla 20.**

*Cuantificación de azúcares reductores en lodo líquido*

|       | <b>Tratamiento<br/>alcalino sin<br/>lavar</b> | <b>Tratamiento<br/>o alcalino<br/>después de<br/>lavar</b> | <b>Tratamiento<br/>o ácido sin<br/>lavar</b> | <b>Tratamiento<br/>o ácido<br/>después de<br/>lavar</b> | <b>Hidrolizado</b> |
|-------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------|
| Abs 1 | -0.192                                        | -0.139                                                     | -0.061                                       | -0.001                                                  | 1.533              |

|                           |         |         |        |        |        |
|---------------------------|---------|---------|--------|--------|--------|
| Abs 2                     | -0.189  | -0.148  | -0.068 | 0      | 1.539  |
| Abs prom                  | -0.191  | -0.144  | -0.065 | -0.001 | 1.536  |
| Azúcares reductores (g/L) | -0.1474 | -0.0532 | 0.1053 | 0.2337 | 3.3159 |

**Tabla 21.***Cuantificación de azúcares reductores en lodo húmedo*

|                           | Tratamiento<br>alcalino sin<br>lavar | Tratamiento<br>alcalino<br>después de<br>lavar | Tratamiento<br>ácido sin<br>lavar | Tratamiento<br>ácido<br>después de<br>lavar | Hidrolizado |
|---------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------|-------------|
| Abs 1                     | -0.128                               | -0.099                                         | -0.001                            | 0.042                                       | 1.816       |
| Abs 2                     | -0.135                               | -0.103                                         | 0                                 | 0.049                                       | 1.79        |
| Abs prom                  | -0.132                               | -0.101                                         | -0.001                            | 0.046                                       | 1.803       |
| Azúcares reductores (g/L) | -0.0291                              | 0.0321                                         | 0.2337                            | 0.3260                                      | 3.8516      |

**Tabla 22.***Resultados de la determinación de la actividad enzimática*

| Dilución           | Absorbancia | [Glucosa]<br>(mg/mL) | Glucosa<br>total (mg) | Actividad<br>enzimática<br>(FPU/mL) | Actividad<br>total (U) | Actividad<br>específica<br>(U/g) |
|--------------------|-------------|----------------------|-----------------------|-------------------------------------|------------------------|----------------------------------|
| 1:40               | 0.049       | 0.33300              | 8.1585                | 0.0906                              | 2.2189                 | 443.79                           |
| 01:40<br>duplicado | 0.071       | 0.37713              | 9.2397                | 0.1026                              | 2.5130                 | 502.60                           |
| 1:20               | 0.134       | 0.50351              | 12.3360               | 0.1369                              | 3.3552                 | 671.03                           |
| 01:20<br>duplicado | 0.127       | 0.48947              | 11.9920               | 0.1331                              | 3.2616                 | 652.32                           |
| 1:10               | 0.276       | 0.78837              | 19.3149               | 0.2144                              | 5.2533                 | 1050.66                          |

|                    |       |         |         |        |        |         |
|--------------------|-------|---------|---------|--------|--------|---------|
| 01:10<br>duplicado | 0.275 | 0.78636 | 19.2658 | 0.2139 | 5.2399 | 1047.98 |
| 1:05               | 0.534 | 1.30592 | 31.9950 | 0.3552 | 8.7020 | 1740.40 |
| 01:05<br>duplicado | 0.521 | 1.27984 | 31.3561 | 0.3481 | 8.5282 | 1705.65 |

**Tabla 23.***Datos de la curva de calibración de etanol*

| g eta | moles Eta | moles H <sub>2</sub> O | Xeta | [etanol] g/L | IR     |
|-------|-----------|------------------------|------|--------------|--------|
| 0.79  | 0.02      | 0.50                   | 0.03 | 78.69        | 1.3388 |
| 1.58  | 0.03      | 0.44                   | 0.07 | 157.37       | 1.3469 |
| 2.37  | 0.05      | 0.39                   | 0.12 | 236.06       | 1.3504 |
| 3.16  | 0.07      | 0.33                   | 0.17 | 314.75       | 1.3534 |
| 3.95  | 0.09      | 0.28                   | 0.24 | 393.43       | 1.3574 |
| 4.73  | 0.10      | 0.22                   | 0.32 | 472.12       | 1.3602 |
| 5.52  | 0.12      | 0.17                   | 0.42 | 550.81       | 1.3625 |
| 6.31  | 0.14      | 0.11                   | 0.55 | 629.50       | 1.3637 |
| 7.10  | 0.15      | 0.06                   | 0.74 | 708.18       | 1.362  |

**Tabla 24.***Consumo Energético - Lodo Líquido*

| Equipo                    | Voltaje<br>(V) | Potencia<br>(kW) | Horas<br>de uso | Consumo<br>energético (kWh) | Costo energético<br>(USD) |
|---------------------------|----------------|------------------|-----------------|-----------------------------|---------------------------|
| Autoclave                 | 115            | 1.5              | 10.5            | 15.75                       | 1.575                     |
| Balanza analítica         | 115            | 0.2              | 0               | 0                           | 0                         |
| Balanza semi<br>analítica | 115            | 0.2              | 1.75            | 0.35                        | 0.035                     |
| Bomba de vacío            | 115            | 0.3              | 3.17            | 0.95                        | 0.095                     |
| Espectrofotómetro         | 240            | 0.2              | 3.92            | 0.784                       | 0.0784                    |
| Estufa                    | 250            | 2.5              | 12              | 30                          | 3                         |
| Incubadora                | 250            | 1                | 274             | 274                         | 27.4                      |
| Manta                     | 120            | 0.5              | 4               | 2                           | 0.2                       |

|               |     |     |        |               |              |
|---------------|-----|-----|--------|---------------|--------------|
| Plancha       | 120 | 1   | 478.67 | 478.67        | 47.87        |
| Potenciómetro | 115 | 0.2 | 1.03   | 0.206         | 0.0206       |
| Sorbona       | 115 | 0.5 | 7.33   | 3.665         | 0.3665       |
| Vortex        | 115 | 0.1 | 0.67   | 0.067         | 0.0067       |
| <b>Total</b>  |     |     |        | <b>815.73</b> | <b>80.64</b> |

**Tabla 25.***Consumo Energético - Lodo Húmedo*

| <b>Equipo</b>          | <b>Voltaje (V)</b> | <b>Potencia (kW)</b> | <b>Horas de uso</b> | <b>Consumo energético (kWh)</b> | <b>Costo energético (USD)</b> |
|------------------------|--------------------|----------------------|---------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Autoclave              | 115                | 1.5                  | 3                   | 4.5                             | 0.45                          |
| Balanza analítica      | 115                | 0.2                  | 0                   | 0                               | 0                             |
| Balanza semi analítica | 115                | 0.2                  | 1.08                | 0.0216                          | 0.00216                       |
| Bomba de vacío         | 115                | 0.3                  | 2.83                | 0.849                           | 0.0849                        |
| Espectrofotómetro      | 240                | 0.2                  | 0.25                | 0.05                            | 0.005                         |
| Estufa                 | 250                | 2.5                  | 3.5                 | 8.75                            | 0.875                         |
| Incubadora             | 250                | 1                    | 274                 | 274                             | 27.4                          |
| Manta                  | 120                | 0.5                  | 4                   | 2                               | 0.2                           |
| Plancha                | 120                | 1                    | 550.25              | 550.25                          | 55.03                         |
| Potenciómetro          | 115                | 0.2                  | 0.7                 | 0.14                            | 0.014                         |
| Sorbona                | 115                | 0.5                  | 4.33                | 2,165                           | 0.2165                        |
| Vortex                 | 115                | 0.1                  | 0.13                | 0.013                           | 0.0013                        |
| <b>Total</b>           |                    |                      |                     | <b>842.67</b>                   | <b>84.47</b>                  |

**Tabla 26.***Cálculo de Costo Total de Producción - Lodo Líquido y Lodo Humedo*

| <b>Descripción</b>        | <b>Valor – Lodo líquido</b> | <b>Valor – Lodo húmedo</b> |
|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Costo Total de Reactivos  | 199.18                      | 52.41                      |
| Costo Total de Energía    | 80.64                       | 84.27                      |
| Costo Total de Producción | 279.82                      | 136.68                     |

|                               |                 |                |
|-------------------------------|-----------------|----------------|
| Etanol Producido (L)          | 0.44            | 0.0377         |
| Costo por L de Etanol (USD/L) | $\approx 636.9$ | $\approx 3676$ |

## Apéndice B

**Imagen 1.**

*Aspecto del lodo líquido*



**Imagen 2.**

*Aspecto del lodo húmedo*



**Imagen 4.**

*Tratamiento alcalino*



**Imagen 3.**

*Filtrado después del tratamiento alcalino*



**Imagen 5.**

*Aspecto del lodo pretratado con NaOH luego del secado*



**Imagen 6.**

*Tratamiento ácido*



**Imagen 7.**

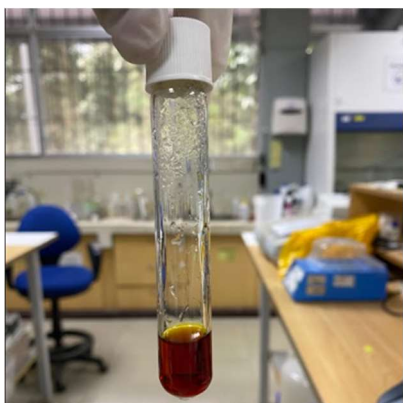
*Lavados y filtrados del lodo*

**Imagen 8.**

*Aspecto del lodo con los pretratamientos luego del secado*

**Imagen 9.**

*Medición de azúcares reductores*

**Imagen 10.**

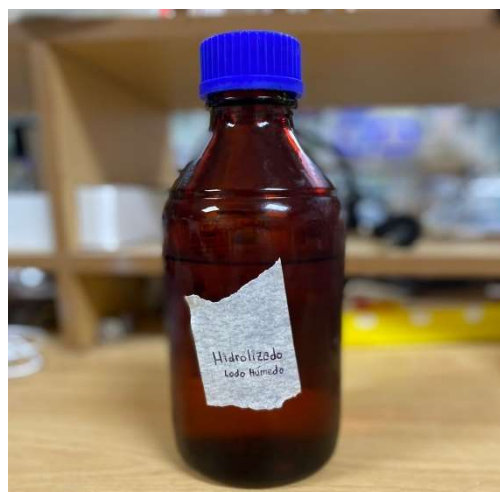
*Determinación de la actividad enzimática*

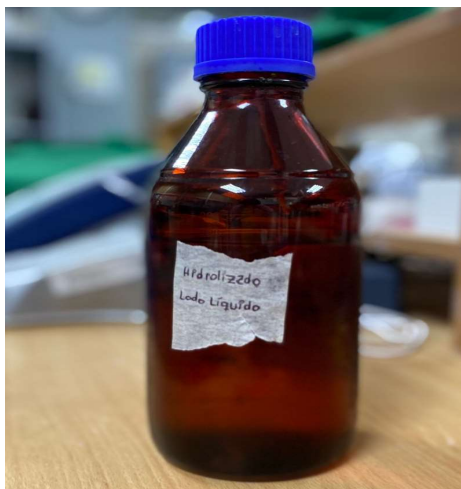
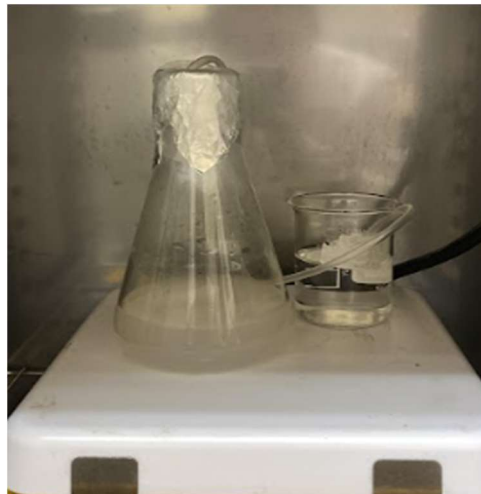
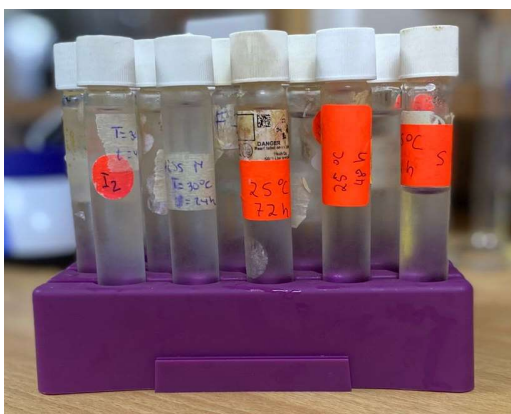
**Imagen 11.**

*Hidrólisis enzimática*

**Imagen 12.**

*Hidrolizado del lodo húmedo*



**Imagen 13.***Hidrolizado del lodo líquido***Imagen 14.***Fermentación alcohólica***Imagen 15.***Sistema de destilación***Imagen 16.***Bioetanol***Imagen 17.***Fracciones de destilados del lodo húmedo***Imagen 18.***Fracciones de destilados del lodo líquido*

**Imagen 19.**

*Densidad mediante picnómetro*



**Imagen 20.**

*Espectrofotómetro FTIR*

