

Producción de bioetanol y de ácido cítrico a partir de residuos de frutas y vegetales

Ingrid Torres Villanueva ¹, Claudia Valeria Nava Hernández ¹, Ailed González Sánchez ², María Del Carmen Bárcenas Grangeno ¹, Guillermo Manuel González Guerra ^{2,3,*}, Fernando Israel Gómez Castro ².

¹ Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Cerro de la Venada s/n, Guanajuato, Guanajuato, 36040, México.

² Departamento de Ingeniería Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, Col. Noria Alta, Guanajuato, Guanajuato, 36050, México.

³ CONAHCyT, Avenida Insurgentes Sur 1582, Crédito Constructor, Ciudad de México, 03940, México. gm.gonzalezquerra@ugto.mx.

Resumen

Los residuos sólidos urbanos (RSU) son una de las principales problemáticas ambientales a nivel social. Aproximadamente el 50% de los RSU se componen de residuos orgánicos. En México, la gestión de residuos orgánicos representa un desafío significativo debido a la gran cantidad producida y a la necesidad de encontrar alternativas sostenibles para su manejo. En el estado de Guanajuato, la producción de frutas y vegetales genera una cantidad significativa de residuos que plantean desafíos ambientales y económicos. Una solución prometedora para aprovechar estos residuos es la producción de bioetanol y la búsqueda de técnicas favorables para la obtención de ácido cítrico. Existen avances sobre los procesos de conversión para obtener bioetanol y otros co-productos como el ácido cítrico a partir de residuos agroalimentarios; sin embargo, la mayoría de los trabajos publicados se basan en un único residuo para la obtención de los productos. En el presente trabajo se realizó la síntesis de bioetanol a partir de la mezcla de residuos de zanahoria, brócoli, piña y mango; asimismo, se obtuvo ácido cítrico a partir de residuos de grana. Los productos obtenidos se analizan por su contenido de azúcares totales y por refractometría; además, se realizó un análisis cinético para la cuantificación de la conversión de azúcares reductores y de la producción de ácido cítrico.

Palabras clave: Residuos sólidos urbanos, bioetanol, ácido cítrico.

1. Introducción

Los residuos sólidos urbanos son una de las principales problemáticas ambientales a nivel social. Aproximadamente el 50% de los RSU se componen de residuos orgánicos (RO) [1]. Los RO comprenden una amplia gama de materiales biodegradables, como restos de alimentos, residuos de jardinería, y desechos de la industria agrícola y forestal; los cuales presentan un procesamiento inadecuado, promoviendo el avance del cambio climático y sus efectos negativos [1].

En México, la gestión de residuos orgánicos representa un desafío significativo debido a la gran cantidad producida y a la necesidad de encontrar alternativas sostenibles para su manejo. La Comisión para la Cooperación Ambiental (CCA) reporta que, en México, la generación anual per cápita es de 327.3 millones de toneladas, de las cuales, solo el 7% es destinada para un segundo uso como digestión anaeróbica y compostaje industrial [1]. En el estado de Guanajuato, la producción de frutas y vegetales genera una cantidad significativa de residuos que plantean desafíos ambientales y económicos. Estos residuos, que incluyen cáscaras, pulpas y semillas de frutas como el mango, naranja, granada, así como vegetales como el brócoli y la zanahoria, entre otros. De estos, se estiman un total de 3,472,573 toneladas anuales [2], representando una oportunidad para ser aprovechados como materias primas en la generación de bioproductos.

Los RO, primordialmente restos de fruta, están constituidos en un mayor porcentaje de pectina, hemicelulosa, lignina y celulosa. El contenido de celulosa es de gran importancia, debido a que es un polisacárido formado por cadenas de beta-glucosa, las cuales es prioritario hidrolizar para obtener los azúcares fermentables que permiten la obtención de etanol y ácido cítrico [3].

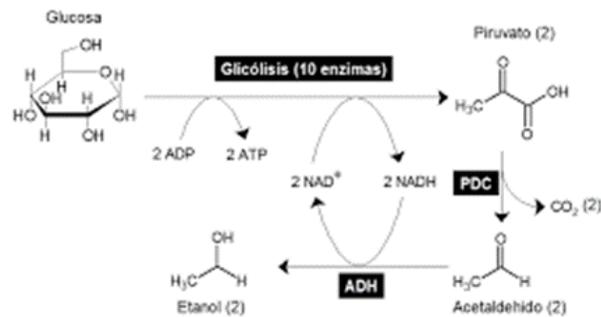


Figura 1. Ruta metabólica de la fermentación para la producción de biocombustible producida por *S. cerevisiae*.

En la Figura 1 se muestra el proceso de fermentación alcohólica, este es llevado a cabo usualmente con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, pues este microorganismo oxida los azúcares reductores presentes en la muestra a través del proceso de glicólisis, donde el piruvato generado es retenido en una catálisis enzimática por el piruvato descarboxilasa y el alcohol deshidrogenasa; lo que desemboca en la producción del etanol, además de CO₂ como residuo [6].

Por otro lado, el ácido cítrico se encuentra en la familia de los ácidos carboxílicos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, ya sea en su forma original o en algunos de sus derivados (ésteres, amidas y anhídridos), en este caso un ejemplo es el ácido cítrico que se encuentra en las frutas como la mandarina, la naranja, la granada. La producción del ácido cítrico es actualmente una de las más reproducibles gracias a la capacidad del hongo *Aspergillus niger* para producir cantidades significativas de este ácido en medio con presencia de azúcar [7].

Un tipo de residuo de fruta que se produce en altas proporciones en México es el de granada (*Punica granatum L.*), la cual se genera en más de 8,500 toneladas por año en 17 estados del país [15]. Esta alta producción ocasiona su desperdicio. Adicionalmente, la cáscara de la granada regularmente no se consume. Con el fin de establecer una estrategia para aprovechar estos residuos, evitando así su inadecuada disposición, en este trabajo se propone una ruta de síntesis de un producto de alto valor agregado, ácido cítrico, a partir de residuos de la granada, evaluando el efecto de las condiciones de operación de las etapas que conforman el proceso sobre el rendimiento hacia el producto deseado.

Tanto el bioetanol como el ácido cítrico son productos de alto valor que pueden ser obtenidos a partir de la fermentación de los azúcares y otros componentes presentes en los residuos de frutas [5]. El bioetanol se utiliza como biocombustible y en diversas aplicaciones industriales, mientras que el ácido cítrico tiene aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Además, el uso de bioetanol puede generar beneficios económicos al fomentar nuevas industrias y empleos en el sector de biocombustibles y generar sinergias con el sector agroalimentario. Asimismo, su uso contribuye a reducir emisiones de gases invernadero. Por otra parte, la producción de ácido cítrico es uno de los procesos microbianos industriales más grandes del mundo, aproximadamente el 70% de la producción total de 1,5 millones de toneladas por año se utiliza en la industria de alimentos y bebidas como acidificante o antioxidante para preservar y mejorar los sabores y aromas de los productos comerciales como jugos de fruta, mermeladas, helados, etcétera [7]; 20% se usa en la industria farmacéutica como antioxidante para conservar las vitaminas, efervescentes, correctores de pH [7], entre otras. El 10% faltante, se emplea para el tratamiento de textiles, en la metalurgia, industria de detergentes, hasta en el cemento. En este último, el proceso de obtención del ácido representa rutas costosas y poco amigables con el medio ambiente.

El aprovechamiento de los residuos de frutas y vegetales para la producción de bioproductos tienen un gran potencial, debido a que podría reducir el impacto ambiental negativo asociado con la gestión de residuos; además, diversificar las fuentes de ingreso para los productores agrícolas y fomentar la creación de empleos en sectores relacionados con la bioindustria. Aquí se debe resaltar el estado del arte: Desafortunadamente, actualmente un gran número de trabajos para la obtención de bioproductos se basan en utilizar solo una única materia prima [2, 4, 6, 8, 9, 10, 13], lo que resulta poco viable dada la heterogeneidad de los residuos.

En el presente trabajo, se realizó la síntesis de bioetanol a partir de residuos de mango, zanahoria, brócoli y piña, siguiendo la ruta de síntesis propuesta por el grupo de trabajo [4,9] obteniendo un análisis cinético en la etapa fermentativa para el análisis de la evolución en la producción de bioetanol. Además, se lleva a cabo la caracterización por medio de la cuantificación de azúcares totales y por refractometría. Asimismo, se realizó la producción de ácido cítrico a partir de residuos de granada, siguiendo la ruta de síntesis propuesta por el

grupo de trabajo [6], se obtuvo un análisis cinético de la conversión del ácido cítrico a partir de espectroscopia UV-Vis.

2. Metodología

2.1. Producción de bioetanol a partir de residuos de zanahoria, brócoli, piña y mango.

Se realizó una síntesis con residuos de mango, zanahoria, brócoli y piña; en proporción 1:1:1:1 siguiendo la síntesis realizada anteriormente en el grupo de trabajo [4], descrito a continuación.

Inicialmente se llevó a cabo un proceso de secado en un deshidratador comercial (SAGAON Tech V2) bajo las siguientes condiciones: temperatura 60 °C durante 48 horas, posteriormente se preparó 6 gr proporcionales a cada residuo (piña, mango, brócoli y zanahoria), con el que se inició la etapa de hidrólisis que consistió en añadir H₂SO₄ 1 M, se colocó en un baño María y se midió el tiempo de tratamiento a partir de que llegó a la temperatura de 60°C durante 60 min. Se neutralizó con NaOH 3 M hasta que se alcanzó un pH de 4-5, esto con el fin de eliminar la mayor cantidad de ácido en la muestra. Después se agregó un exceso de NaOH 3 M para ajustar el pH entre 10-11. Se tuvo cuidado en no sobrepasar ese pH, ya que si se superaba se favorecía la degradación de los azúcares [4]. Las muestras se dejaron reposar y en refrigeración por 24 horas. Pasadas las 24 horas se agregó H₂SO₄ 1 M para llevar las muestras nuevamente a un pH de 4-5. En la etapa de fermentación se añadió 0.75 g de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en seguida se agregaron 200 mg de NH₄H₂PO₄ en atmósfera de nitrógeno, estos dos últimos para optimizar y darle nutrientes a la levadura y se dejó en calentamiento a 30°C durante 9 días. Por último, se le realizó una centrifugación a 2000 rpm durante 25 min en una centrifugadora (Zenith Lab).

2.1.1. Obtención de azúcares totales.

Para esta medición, se realizó una curva de calibración basada en el método de fenol-sulfúrico [12] Se prepararon patrones de glucosa de 10-80 mg/L. Posteriormente se mezcló 2 mL de la muestra con 2 mL de fenol al 5%, los tubos se colocaron en un baño de hielo en el que se le añadió 5 mL de H₂SO₄ al 96% realizando una agitación rápidamente, seguido se dejó reposar 15 min en un baño de hielo. Finalmente se realizó la lectura en un equipo de ultravioleta visible (Fencia, espectrofotómetro visible, rango 350-1020 nm) a 490 nm.

2.1.2. Cinética de azúcares reductores.

Para el análisis cinético de la producción de bioetanol, se tomaron muestras cada 24 horas durante 9 días durante la fase de fermentación.

Se realizó una curva de calibración basado en el método DNS [11]. Para esto, se prepararon soluciones de 200, 400, 600, 800 y 1000 mg/L utilizando glucosa estándar, en el que se mezcló 0.5 mL de las muestras obtenidas con 0.5 mL de reactivo DNS, posteriormente se colocó a ebullición por 7 minutos en un baño María e inmediatamente se detuvo la reacción en baño de agua y hielo durante 7 minutos. En seguida se agregó 5 mL de agua destilada y se agitó, se dejó reposar durante 15 minutos. Por último, se realizaron las lecturas de absorbancia en el equipo de ultravioleta visible Fencia, espectrofotómetro visible, rango 350-1020 nm a una longitud de 540 nm.

2.1.3. Análisis por refractometría.

Se analizó 4 muestras de la síntesis de bioetanol; 2 de residuos de la parte de post-neutralización y 2 correspondientes a la parte de la síntesis, por lo que cada día de la fermentación se recolectó 2 mL en viales para su posterior análisis, así como también se recolectó 0.5 mL para el análisis del %Brix en un refractómetro digital (Rhino Honey Digital Refractómetro IP65). La comparación de estos resultados se muestra en la Figura 3. de la parte de resultados.

2.2. Producción de ácido cítrico a partir de residuos de granada.

Se recolectaron muestras de residuos de granada en las áreas verdes de la *División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato*. Posteriormente estos residuos fueron separados en cáscara y frutilla por un proceso de secado en un deshidratador (SAGAON Tech V2).

Cabe resaltar, que los análisis se realizaron para muestras secas de 24 gr en relación 1:1, 12 gr de cascara y 12 gr de frutilla. Las muestras son posteriormente pulverizadas y neutralizadas empleando NaOH 1 M, con el fin de ajustar el pH hasta un valor de 8.0. Se lleva a cabo el cultivo de *Aspergillus niger* realizando la siembra del hongo en agar de papa, incubando por 5 días a 28 °C, posterior a este tiempo se cuantificaron las conidias formadas del hongo a través del cálculo de las Unidades Formadoras de un Líquido (UFC) utilizando una cámara de Neubauer.

Una vez que se cuenta con el microorganismo, se realiza la fermentación de las muestras a 25 °C por 9 días, en una atmosfera de nitrógeno, posteriormente se realizó un proceso de centrifugado para separar la fase sólida y llevar a está a una posterior metodología para la purificación del ácido cítrico.

2.3. Obtención del porcentaje de celulosa y lignina en las muestras de granada.

Se llevó a cabo la cuantificación de lignina y celulosa utilizando la estrategia reportada por Alvarado Ludeña [14].

2.3.1. Obtención de celulosa

Se colocaron 2 gr de muestra molida de cáscara y frutilla de la granada recolectada en la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato con relación en peso de 44.01 % de cáscara y 55.99 % de frutilla. Se agregaron 25 mL de NaOH en un vaso de precipitado de 250 mL, agitando y posteriormente dejando reposar por 30 minutos en baño María a una temperatura de 43 °C, terminando este tiempo se añadieron 30 mL de agua destilada agitando. En seguida, se dejó reposar por 1 hora.

Después de ese tiempo se filtro al vacío y se lavó con 33 mL de agua destilada, se agregó una solución de ácido acético al 10 %. La muestra fue colocada en un deshidratador comercial (SAGAON Tech V2) en un lapso de 4 horas a 80 °C.

2.3.2. Obtención de lignina

Se colocaron 2 gr de muestra molida de cáscara y frutilla de granada con relación en peso de 44.01 % de cáscara y 55.99 % de frutilla. Se añadieron 15 mL de H₂SO₄ al 40 % a una temperatura de 13 °C agitando constantemente por 1 minuto. Se vertió la mezcla en un vaso de precipitado de 500 mL y se diluyó la concentración del ácido agregando 200 mL de agua destilada. Posteriormente se llevó a calentar hasta ebullición dejando la mezcla por 2 horas a 70 °C; después, se dejó enfriar hasta observar una decantación del material insoluble.

Se llevó una filtración al vacío después de que se dejó enfriar a temperatura ambiente, se lavó el precipitado con 500 mL de agua caliente destilada, hasta que se dejó libre de ácido y se secó el papel filtro con el precitado en un deshidratador comercial (SAGAON Tech V2) por 4 horas a 100 °C.

Estos procedimientos se describen en las Figura 7 y 8 (derecha celulosa, izquierda lignina) para mostrar los pasos resumidos en la sección de resultados, para asegurar la precisión y reproducibilidad de los datos obtenidos.

3. Resultados

3.1. Producción de bioetanol a partir de residuos de zanahoria, brócoli, piña y mango.

En la Figura 2 se muestra un diagrama del procedimiento seguido para la producción de bioetanol con mezclas de residuos frutales y de verdura en relación 1:1:1:1. Esta estrategia se basa en lo reportado por González-Guerra et al. para una mezcla de brócoli y zanahoria [4]

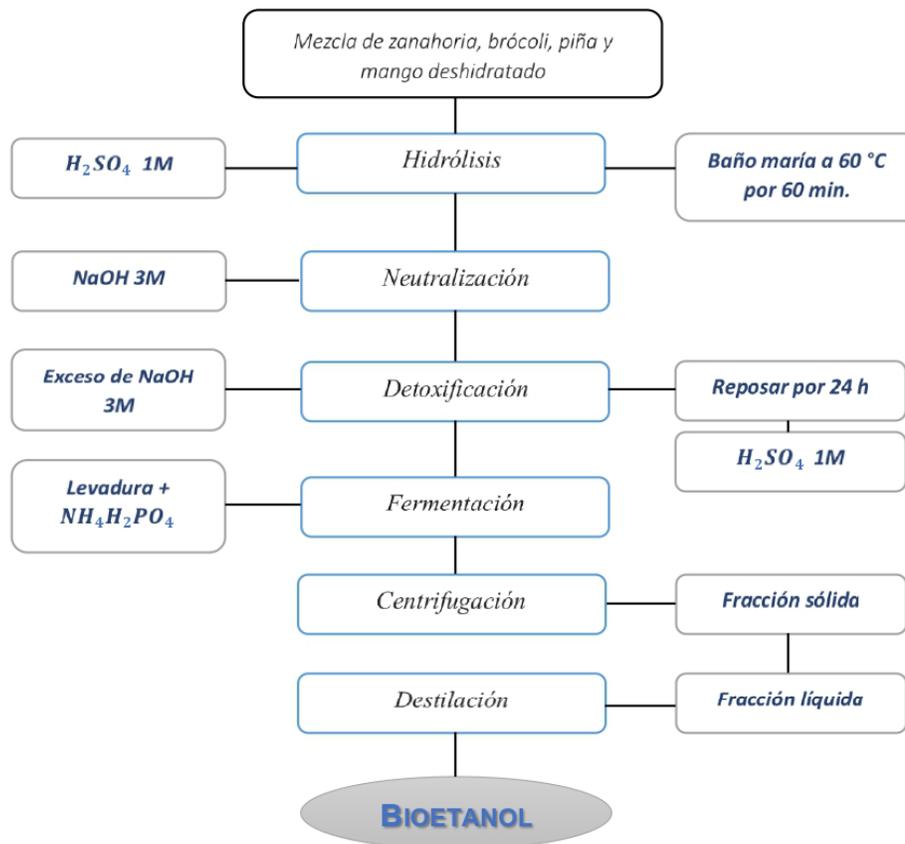


Figura 2. Diagrama de la metodología para síntesis de bioetanol a partir de RO (piña, mango, zanahoria y brócoli).

3.1.1. Obtención de azúcares totales y análisis por refractometría.

La determinación del contenido de azúcares totales se basó en el análisis de las muestras tomadas del día 0 al 9 de la etapa de fermentación. En la Figura 3 se aprecia la cantidad de azúcares iniciales y los finales, en donde no se aprecia un cambio significativo, obteniéndose una cantidad de gramos iniciales de 4.180 gr/L y finales de 4.280 gr/L, lo que es indicativo que probablemente no se estén aislando todos los azúcares, esto para la conversión a etanol.

Por otro lado, en el análisis de refractometría se hace una comparación con lo obtenido en la cuantificación de azúcares totales. Cabe mencionar, que el método espectrofotométrico UV-Vis cuantifica únicamente los azúcares totales en la muestra, y la refractometría no hace diferencia entre azúcares totales, reductores y no reductores, por lo que la cuantificación puede ser mayor. Por lo anterior, para el caso de la muestra en el día 0 y al día 9; se puede apreciar que al final de la fermentación los grados Brix se potencializan casi al doble, lo que puede ser indicativo que los azúcares se están aislando. La proporción propuesta es adecuada, ya que tiene un mayor contenido de azúcares comparado a lo reportado por el grupo de trabajo para una mezcla de brócoli y zanahoria [4].

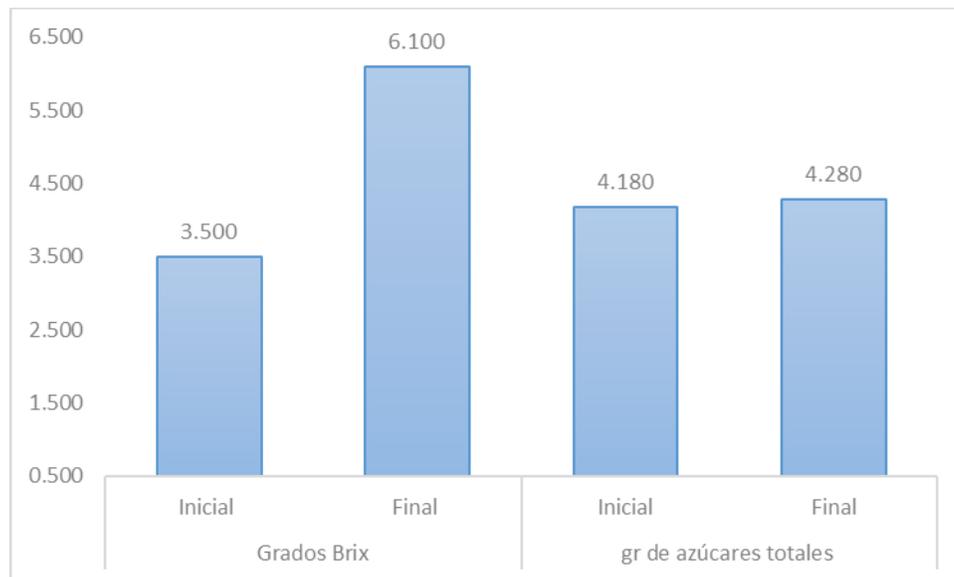


Figura 3. Gráfica de azúcares totales iniciales y finales en g/L de la cinética de la síntesis con relaciones 1:1:1:1 de las RO (piña, mango, zanahoria, brócoli).

3.1.2. Cinética de azúcares reductores

Para la cuantificación de azúcares reductores, se realizó una curva de calibración en la cual se obtuvo un R^2 de 0.989. En la Figura 4, se muestran los resultados obtenidos para la cinética en la producción de bioetanol. Como se puede observar hay una conversión de 93.10%, iniciando con 111.7 gr/L hasta obtener 7.680 gr/L en el día 9 de la fermentación. Por lo tanto, tenemos que la metodología propuesta permite aislar los azúcares reductores para su posterior conversión a etanol.

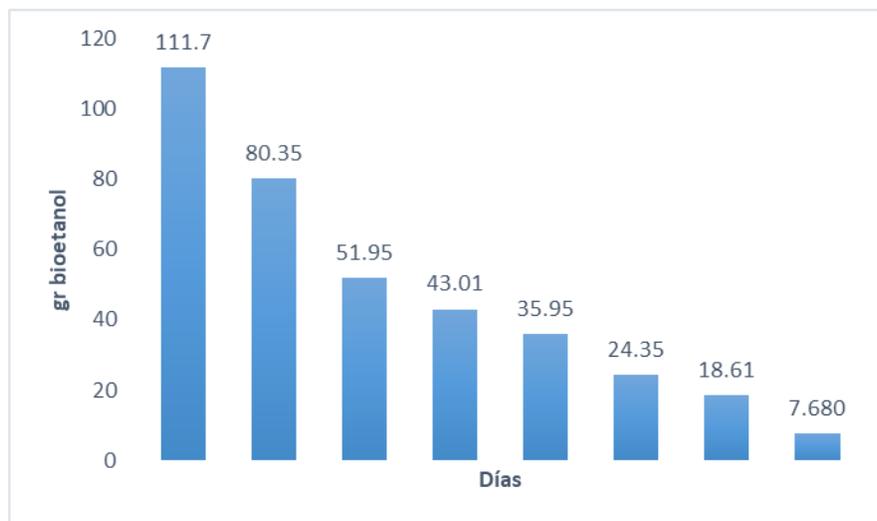


Figura 4. Cinética de producción de bioetanol a partir de RO relación 1:1:1:1 (piña, mango, zanahoria y brócoli)

3.2. Producción de ácido cítrico a partir de residuos de granada.

En la Figura 5, se muestra un diagrama que resume el proceso de obtención del ácido cítrico a partir de los residuos de granada.

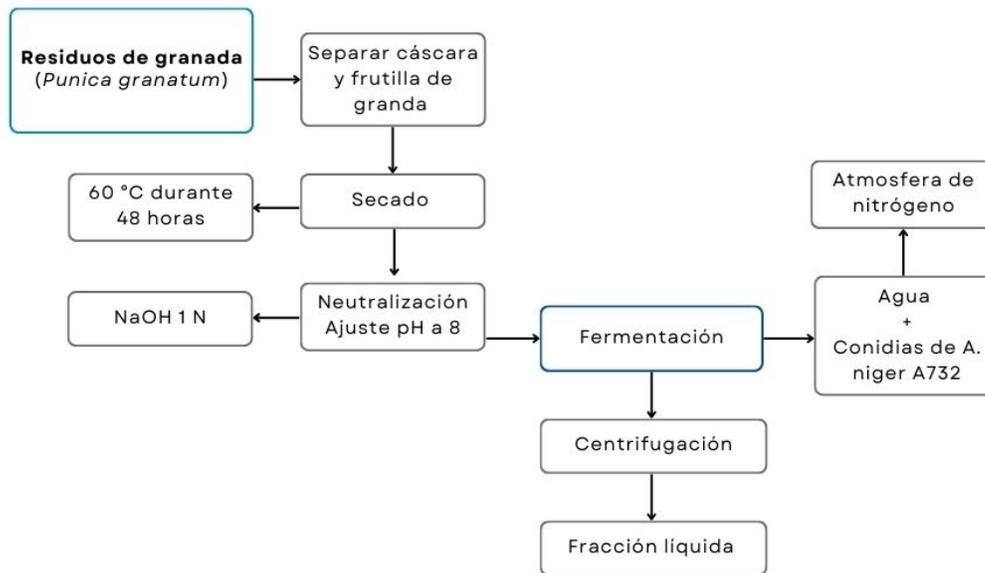


Figura 5. Diagrama para la obtención del ácido cítrico [6].

3.2.3. Cinética de formación del ácido cítrico

Para la determinación de la formación de ácido cítrico, se realizó una curva de calibración obteniendo un R^2 igual a 0.9725, posteriormente, a partir de la curva, se analizaron las muestras recolectadas del día 0 hasta el día 9 en la fermentación. En la Figura 6 se muestra la cantidad de ácido cítrico formado. Se puede observar que en el día 0 hay un valor de 3.423 gr/L y en el día 9 hay un valor de 0.980 gr/L, esto representa un decremento en la formación del ácido cítrico, lo que puede deberse a que, en el análisis, las impurezas y el azeótropo que se forma causan interferencia en la cuantificación del método. También, puede deberse a que el microorganismo usado no se adaptó al medio, por lo cual la levadura comenzó a morir y, por tanto, hubo una disminución en las concentraciones de ácido presentes, tal como lo sugiere Velásquez J.A. *et. al.* [8].

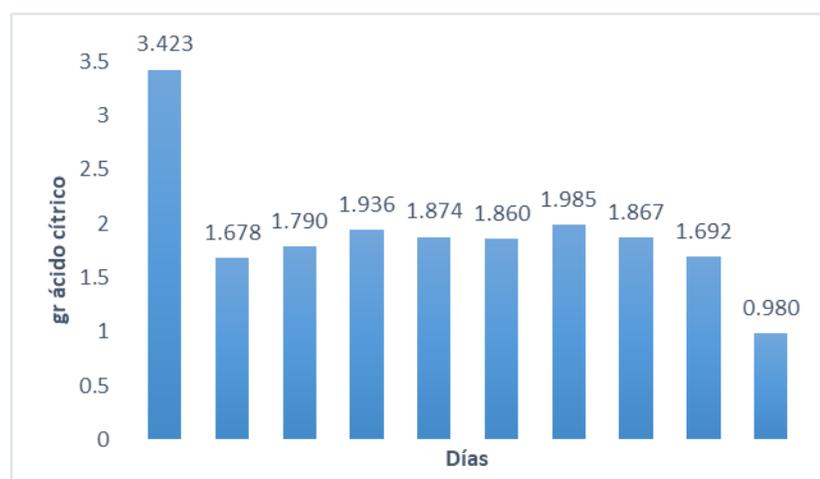


Figura 6. Resultados en gr/L de las muestras de ácido cítrico desde el día 0 hasta el día 9 (de izquierda a derecha).

Los resultados mostrados en la Figura 6 se complementan con lo mostrado en la Tabla 1, en la cual se presenta la cuantificación de ácido cítrico posterior al proceso de centrifugación y de purificación, dando valores de 2.244 gr/L y 6.235 gr/L, respectivamente. Lo anterior es indicativo de que, al purificar las muestras obtenidas posteriores al proceso de conversión, se tiene un aumento en la cantidad de ácido cítrico inicial, de aproximadamente el doble.

Tabla 1. Resultados en gr/L de las muestras de ácido cítrico con un proceso de separación.

MUESTRA	gr/L
Centrifugada	2.244
Purificada	6.235

Finalmente, se desarrolló una metodología para la obtención del porcentaje de lignina y celulosa. Esta metodología se detallada en las Figura 7 y en la Figura 8 respectivamente. Acorde con la metodología seguida, se obtuvo que la mezcla de granada (cáscara y frutilla, en relación 1:1) contiene un 9.44% de celulosa; adicionalmente, se obtuvo un porcentaje del 8.48% en contenido de lignina. Dichos porcentajes son menores comparados a lo reportado en la bibliografía: 17% y 27% respectivamente [3]; sin embargo, se puede atribuir al hecho que los cálculos presentados en el trabajo previo se basan únicamente en la cascara de la granada.

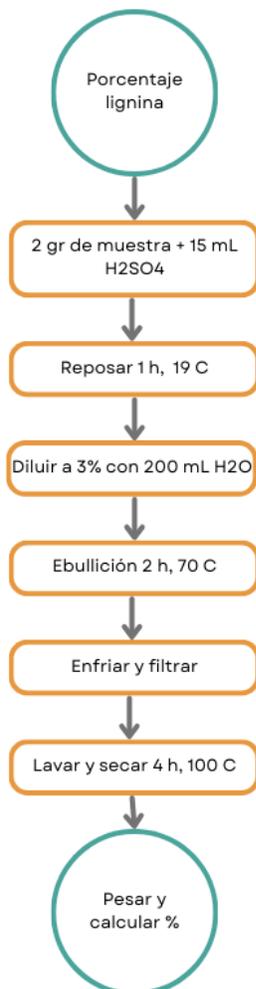


Figura 7. Metodología para obtener porcentaje de lignina.



Figura 8. Metodología para obtener porcentaje celulosa

Conclusiones

Se realizaron exitosamente procesos de conversión de residuos agroalimentarios para la producción de etanol y de ácido cítrico. Se obtuvo un análisis cinético en la etapa de fermentación para la obtención del etanol, en donde se resalta una conversión mayor al 90%. Para el ácido cítrico se han obtenido altas cantidades del producto después de la etapa de purificación, obteniendo valores mayores a los 6 gr/L. El desarrollo de estas metodologías es de gran relevancia, promoviendo el aprovechamiento de mezclas de residuos como materia prima. Asimismo, se ha identificado el efecto de la variabilidad en la composición de la materia prima, así como la viabilidad de la ruta de conversión con distintos tipos de residuos. Asimismo, se ha establecido una ruta de procesamiento para la co-producción de un biocombustible y un bioproducto, aprovechando las características de la biomasa disponible en la región.

Bibliografía

- [1] De Anda-Trasviña, A; García-Galindo, E; Peña-Castañón, A; Seminario-Peña, J; Nieto-Garibay, A. (2021). Recursos Naturales y Sociedad. Vol. 7 (3): 19-42. <https://doi.org/10.18846/renaysoc.2021.07.07.03.0004>
- [2] Gómez-Castro, F.I; González-Guerra, G.M; Restrepo-Elorza, M.P; Montiel-Carrillo, A.P; Álvarez-Rivera, K.Y; Linares-Luna, R.G; Hernández, S. (2022). Residuos de frutas y vegetales como materias primas para la producción de biocombustibles: potencial en el estado de Guanajuato. Digital Ciencia @UAQRO. ISSN: 2395-8847. Vol. 15, No. 1, 8-19. <https://revistas.uaq.mx/index.php/ciencia/article/view/697>
- [3] López-Bermúdez, Y.N; García-Nassar, J.J; Duran-Aranguren, D.D; Sierra-Ramírez, R. (2020). Producción de bioetanol a partir de residuos de fruta utilizando *Saccharomyces cerevisiae*: una revisión de las diferentes condiciones y métodos de proceso. Tesis de licenciatura. Departamento de Ingeniería Química y de Alimentos, Universidad de Los Andes, Bogotá, Colombia. <https://repositorio.uniandes.edu.co/server/api/core/bitstreams/27c58536-9b5b-4d51-9e0e-010e35d10d84/content>
- [4] González-Guerra, G. M., Ruiz, J. R. G., Tanamachi, K. S., Del Pilar Restrepo-Elorza, M., Gómez-Castro, F. I., Hernández, S., García-García, J. C., & Gamiño-Arroyo, Z. (2023). Synthesis of bioethanol from mixed vegetable wastes: Experimental methodology and characterization. Engineering Reports. Vol. 6, No. 7, e12784. <https://doi.org/10.1002/eng2.12784>
- [5] Siliceo-Rodríguez, M.L. (2014). Análisis de la productividad industrial de bioetanol. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana. <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/46727/SiliceoRodriguezMLuisa.pdf>
- [6] Villagómez-Ibarra, J; Nava-Hernández, C; Flores-Juárez, E.I; Martínez-Cortés, O.I; González-Guerra, G.M; Gómez-Castro, F.I. (2023). Coproducción de biocombustibles y ácidos orgánicos a partir de residuos de frutas y vegetales. Jóvenes en la Ciencia. 21, 1-8.
- [7] Díaz, B. (2014). Ácido Cítrico: Compuesto Interesante. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila, Vol. 6, No. 12, 18-21.
- [8] Velásquez, J. A; Beltrán, D; Padilla, L; & Giraldo, G. (2010). Obtención de ácido cítrico por fermentación con *aspergillus niger* utilizando sustrato de plátano dominico hartón (musa aab simmonds) maduro. Revista Tumbaga Vol.5. pp (135-147).
- [9] Santos Tanamachi K, Alvarado Ahedo NC, Gárate Ruiz JR, González Guerra GM, Gómez Castro FI, Hernández Castro S. Revaloración de residuos de fruta y verdura Para la producción de biocombustibles. Jóvenes en la Ciencia. 2022; 16, 1-14. <https://www.jovenesenenciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenenciencia/article/view/3654/3151>
- [10] Martínez-Altamiranda, J, L; Fernández-De Castro, D.Z. (2016). Estudio inicial de la producción de etanol a partir de las hojas de palma de aceite mediante un proceso de fermentación y sacarificación simultáneas (SFS). Tesis de licenciatura. Universidad de los Andes.
- [11] Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal.Chem.*31:426-428
- [12] Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal.Biochem.*28:350-356
- [13] Ramírez, C; Pérez, Y; Kafarov, V; Barajas, C; Casillo, E. (2009). Relación entre los azúcares reductores totales (ART), grados Brix y el contenido de sacarosa en mezclas de alimentación a destilerías en la producción dual azúcar –bioetanol en Colombia. Revista ION, Bucaramanga (Colombia), 22(1): 25-34.

- [14] Alvarado Ludeña G. R. (2021). Obtención de bioetanol a partir del bagazo de la caña de azúcar mediante hidrólisis enzimática. [Título profesional, Universidad Politécnica Salesiana]. Repositorio Académico de la Universidad Politécnica Salesiana. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/21229/1/UPS-CT009334.pdf>.
- [15] Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2022). La granada: histórica fruta escarlata. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/la-granada-historica-fruta-escarlata>