

Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease

Ramona Ávila Núñez, Bernarda Rivas Pérez, Rómulo Hernández Motzezak y Marluy Chirinos

*Centro de Investigaciones en Ciencias Básicas,
Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Núcleo Académico Los Perozos.
Santa Ana de Coro, Falcón, Venezuela.*

ravila53@gmail.com

Resumen

El objetivo del trabajo fue determinar el contenido de azúcares totales, reductores y no reductores; así como identificar los azúcares presentes en la piña cruda, piña cocida y hojas del *Agave cocui* Trelease. La piña es la parte del Agave que tiene el tallo y la base de las hojas pegadas a él, considerada rica en azúcares. Se utilizaron métodos fotolorimétricos: para los azúcares totales el método de Dubois a 490 nm; para los azúcares reductores, el método de Miller (DNS) a 540 nm y por diferencia se calcularon los azúcares no reductores. Para identificar los azúcares se utilizó cromatografía de alta resolución (HPLC). Los resultados sugieren como azúcares presentes en la piña cruda: fructosa y glucosa; en las hojas: arabinosa y manosa; en la piña cocida: xilosa, arabinosa y manosa. Esta planta es promisoriosa para la obtención de alcoholes que no sólo sirvan para bebidas sino también como biocombustibles.

Palabras clave: Azúcares, *Agave cocui* Trelease, HPLC.

Content of total, Reducing and Non-Reducing Sugars in *Agave cocui* Trelease

Abstract

The objective of this work was to determine the content of total, reducing and non-reducing sugars, as well as to identify the sugars present in the raw “pineapple,” cooked “pineapple” and the leaves of *Agave cocui* Trelease. The “pineapple” is a part of the Agave plant attached to the stem and leaf bases, considered rich in sugars and used to obtain liquor. Photocolormetric methods were used in these determinations: for total sugars, the Dubois method at 490 nm; for reducing sugars, the Miller method (DNS) at 540 nm. Non-reducing sugars were calculated by the difference. Sugars were identified using high performance liquid chromatography (HPLC). Results suggest that the sugars present in the raw pineapple are fructose and glucose; in the leaves, arabinose and mannose; and in the cooked pineapple, xilose, arabinose and mannose. This plant is promising for obtaining alcohol not only for drinking, but also as a biofuel.

Keywords: sugars, *Agave cocui* Trelease, HPLC.

Introducción

Los Agaves son plantas tropicales de usos múltiples entre los cuales destaca su utilización para obtención de licores, el empleo artesanal de la fibra de sus hojas y la aplicación tradicional en la medicina. *Agave cocui* Trelease (comúnmente conocida como cocuy) es una planta que pertenece a la familia *Agavaceae*, debido a sus largos ciclos biológicos (7 a 12 años), son plantas multianuales que forman parte del paisaje natural y rural de las poblaciones donde crecen. Estas plantas son aprovechables antes de la floración; por lo tanto se inhibe la reproducción sexual cortando el eje floral, para asegurar que en el tallo y la base de las hojas se almacenen los polisacáridos [8]. Esta especie venezolana crece en forma silvestre en las zonas áridas y semiáridas de los estados Falcón y Lara [10].

Antes de la llegada de los españoles los Agaves eran utilizados para la producción de azúcares y fibras, los indígenas lo utilizaban como alimento en tiempos de falta de maíz y otros insumos. Su uso decayó cuando el cultivo de la caña de azúcar llegó a América con los conquistadores y se empezó a hacer más relevante en la obtención de licores. Históricamente el *A. cocui* ha sido utilizada desde épocas precolombinas para la producción de licor, y éste se ha comercializado desde principios del siglo XX tanto en Venezuela como en las Antillas Neerlandesas [10].

Uno de los constituyentes principales de los Agaves son los polisacáridos, razón por la cual el pasado y presente de estas plantas están acompañados por la obtención de alcoholes para fabricar licores; sin embargo, el futuro pudiera estar acompañado por la obtención de alcoholes para fabricar combustibles [12]. De la inestabilidad de los precios del petróleo, la inseguridad en el abastecimiento y la preocupación por el medio ambiente, surge la necesidad de desarrollar fuentes alternativas al petróleo en forma de combustibles. Aun cuando Venezuela posee suficiente petróleo, la preocupación por aumentar la seguridad energética y disminuir los daños ambientales ha llevado a pensar en sustitutos para la gasolina o mezclas que sean más limpias desde el punto de vista atmosférico [12, 22]. Entre los biocombustibles más desarrollados se encuentran el bioetanol y el biodiesel; el bioetanol se obtiene a partir de materias primas ricas en carbohidratos entre las que destacan el maíz, sorgo, caña de azúcar y remolacha azucarera principalmente, mientras que el biodiesel se elabora a partir de materias primas ricas en aceites vegetales como la palma aceitera, canola, soya y algodón [1].

Para el año 2007, ya Brasil y Estados Unidos eran los principales países productores de bioetanol en el mundo; el primero a partir de la caña de azúcar y el segundo a partir del almidón de maíz [24]. Buscando materiales que no compitan con materia prima de origen alimentario se han

realizado trabajos en los cuales se han utilizado plantas de Agave para la obtención del bioetanol, tal es el caso de *Agave fourcroydes* Lem [15], las pencas enteras (bases y puntas) de *Agave tequilana* [17, 25] y otras investigaciones, en las que se ha demostrado que el bagazo de agave procedente de la industria agavera contiene azúcares que pueden ser convertidos en etanol para uso combustible [4]. La Revista Global Change Biology BIOENERGY en el año 2011 dedicó un número especial al Agave, centrado en el potencial de esta planta como materia prima para la bioenergía [7]. Una de las ideas expresadas es la necesidad de cultivos bioenergéticos con bajo riesgo de cambio involuntario en el uso de la tierra.

La biomasa de Agave puede ser cosechada como un co-producto de la producción de tequila sin exigencias adicionales de tierra. El Agave, conocido principalmente por su uso en la producción de bebidas alcohólicas y las fibras, se desarrolla en las regiones semiáridas donde es menos probable que entre en conflicto con los alimentos. Es una materia prima única por su alta eficiencia de uso del agua y la capacidad de sobrevivir sin agua entre las lluvias, lo que da potencial como materia prima para la bioenergía [6].

En el procedimiento para la extracción del licor de cocuy, se acostumbra cortar las hojas alrededor del tallo dejando parte de las hojas pegadas al tallo en ese corte, por ser la parte de la planta más rica en azúcares. A ese corte de pseudo tallo con parte de las hojas, es a lo que se le llama corno o piña ya que los cortes lo asemejan a esa fruta [19]. Esta es la parte que después se hornea para obtener el jugo que una vez fermentado por la acción de levaduras (mosto) se destila para obtener el licor de cocuy. Las hojas, en este caso, se consideran como la parte desechable al cortar el corno, ya que se presume que esta parte no es tan rica en azúcares como en fibra [13, 21].

Materiales y métodos

Descripción de las muestras

Las piñas crudas y las hojas de *A. cocui* utilizadas para este trabajo se obtuvieron de plantas que crecen en la población de Pecaya (municipio Sucre del estado Falcón). Las piñas cocidas fueron facilitadas por uno de los productores de cocuy de la zona. El material fue transportado en cavas con hielo al laboratorio del Centro de Investigaciones de Ciencias Básicas (CICBa) de la Universidad Nacional Francisco de Miranda, donde se cortó en pequeños trozos para congelarlo, liofilizarlo y después extraerlo con metanol y realizar el posterior estudio.

Cuantificación de azúcares totales

La concentración de azúcares totales se determinó a través de una curva de calibración de la absorbancia en función de la concentración para la cual se prepararon soluciones de 10-70 mg/L utilizando manosa como estándar. Como blanco para las lecturas se utilizó agua destilada aplicándole el mismo tratamiento. Para la aplicación del método Dubois [9] (Método Fenol-Sulfúrico), se mezclaron 2 mL de muestra con 2 mL de fenol al 5% en tubos digestores y se colocaron en una gradilla sumergida en un baño de agua fría. A los tubos se les añadieron 5 mL de H_2SO_4 , se dejaron reposar por 15 min y se analizaron en un espectrofotómetro (Genesys 10vis) a una longitud de onda de 490 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado para obtener valores promedios. Las desviaciones estándar fueron menores al 5%.

Cuantificación de azúcares reductores

Según el método Miller [16], los azúcares reductores pueden reducir al ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) bajo determinadas condiciones. Cuando el ácido 3,5-dinitrosalicílico es reducido en presencia de calor, por los azúcares reductores que entran en contacto con él, se desarrolla un cambio de color parecido al café (con variaciones de amarillo hasta café). El cambio de coloración puede entonces determinarse por lecturas de densidad óptica, leídas por espectrofotometría a una determinada longitud de onda. La concentración de los azúcares reductores totales liberados en la muestra se determina haciendo una interpolación en la curva patrón del azúcar utilizado, graficando la absorbancia en función de la concentración. Para la aplicación del método DNS de Miller se necesita preparar el reactivo DNS, disolviendo 0,8 g de NaOH en agua destilada, luego se adicionan 15 g de tartrato de sodio y potasio tetra hidratado y 0,5 g de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico).

Esta mezcla se afora a 50 mL con agua destilada y se almacena en un frasco ámbar a 4°C. La concentración de azúcares reductores se determina utilizando una curva de calibración absorbancia en función de concentración. Para obtener esta curva se prepararon soluciones de 200-1000 mg/L, utilizando glucosa como estándar. A estas soluciones se les aplicó el método DNS y se leyó la absorbancia de cada una de ellas en un espectrofotómetro (Genesys 10vis) a una longitud de onda 540 nm. Una vez construida la curva patrón se aplicó el método DNS a cada una de las muestras, para lo cual se mezclaron 0,5 mL de cada una con 0,5 mL del reactivo DNS, se colocaron a ebullición por 5 min en baño de maría e inmediatamente se detuvo la reacción con baño de agua y hielo. Se reconstruye-

ron las muestras con 5 mL de agua destilada, se agitaron, se dejaron en reposo por 15 min, y se determinó su absorbancia a 540 nm. El mismo tratamiento se realizó para el blanco con agua destilada. Leyendo la absorbancia de cada una de las muestras en la curva patrón se determinó la concentración de azúcares reductores. Para el promedio se utilizaron tres replicaciones y las desviaciones estándar fueron máximo de 10%.

Cuantificación de azúcares no reductores

La cuantificación de los azúcares no reductores se obtuvo por diferencia entre los azúcares totales y los azúcares reductores.

Determinación individual de azúcares

Para la identificación de los azúcares presentes en las muestras, por cromatografía de alta resolución, se utilizó la metodología estandarizada por Chirino [5]. Se consideraron siete azúcares: xilosa, arabinosa, fructosa, glucosa, manosa, sacarosa y maltosa. La mezcla de estos azúcares al 1, 5 y 8 % se inyectó al cromatógrafo (Varian) con detector de índice de refracción encontrándose la mejor resolución para los picos presentes con la concentración al 1% utilizando como fase móvil una mezcla Acetonitrilo: Agua en una relación 84:16, un flujo de 1,5 mL/min y una presión de 860psi. En estas condiciones el tiempo total de cromatograma fue de 15 min, utilizando una columna para determinación de carbohidratos (39X300mm).

Las curvas de calibración mostraron coeficientes de correlación muy cercanos a la unidad. Se prepararon soluciones patrones individuales con los azúcares para así determinar el tiempo de retención de cada azúcar, utilizando las mismas condiciones utilizadas en la mezcla e inyectando dos veces para ver la reproducibilidad del método. La comparación del tiempo de retención de cada azúcar (expresado en minutos) con los tiempos de los picos en la mezcla patrón permitió la correlación y asignación de los tiempos de retención de la siguiente manera: xilosa: 4,708; arabinosa: 5,491; fructosa: 6,042; manosa: 6,525; glucosa: 6,851; sacarosa: 11,004 y maltosa: 13,801. Para preparar las muestras se consideraron los extractos de piña cruda, piña cocida y hojas de la planta. De cada una de ellas se pesaron 5 g y se diluyeron con agua destilada a un volumen de 50 mL. Se tomaron 2 mL de cada una de ellas y se filtraron para eliminar las partículas sólidas y luego inyectarlas (por duplicado) a un volumen de 30 μ L en el cromatógrafo. Los tiempos de retención permanecieron casi constantes en las muestras con un mínimo margen de error ya que la desviación estándar fue siempre menor al 2%.

Resultados y discusión

Cuantificación de azúcares totales

El contenido de azúcares totales se determinó aplicando el método Dubois [9], utilizando manosa como estándar (10-70 mg/mL). En la Figura 1 puede verse la curva patrón construida para cuantificar los azúcares totales y en la Tabla 1 los resultados para cada muestra, las cuales fueron diluidas para su lectura y luego multiplicadas por el factor de dilución 10^4 . Estos resultados indican que la menor concentración de azúcares totales se encuentra en las hojas, la piña cruda tiene una concentración mas elevada y la mayor concentración se presenta en la piña cocida.

Cuantificación de azúcares reductores y no reductores

La Figura 2 muestra la Gráfica utilizando glucosa como patrón para determinar el contenido de azúcares reductores y en la Tabla 2 pueden verse los resultados considerando también los respectivos factores de dilución 10^2 . En la misma tabla se presentan las concentraciones de los azúcares no reductores, calculados por diferencia entre los totales y los reductores. Los resultados para azúcares totales y reductores coinciden en que el mayor contenido se encuentra en la piña cruda y el menor en las hojas, esto resulta lógico, puesto que la mayor concentración de azúcares reductores se encuentra en la piña (16 a 28%) y la menor en las hojas (3,3 a 16,1%) [14]. El mayor contenido para la piña cocida posiblemente se deba a la hidrólisis ácida de los polisacáridos ocurrida durante la cocción la cual libera otros azúcares más simples. Los agaves contienen carbohidratos complejos que se degradan por la acción de la acidez del jugo y del calor en el cocimiento [18, 20]. En esta etapa es importante controlar la temperatura, si es mas baja que la necesaria, el polisacárido no se degradará y si es muy alta ocurrirá la caramelización de los azúcares, en ambos casos se tendrá menor cantidad de azúcares [3].

El contenido promedio de azúcares reductores presentes en la piña del agave, varía entre 20 y 30% en peso. Cuando un agave tiene un contenido menor al 20% es considerado de baja calidad y si presenta entre el 25 y 30% es de buena calidad [11, 23]. Este análisis es importante porque el alcohol obtenido en la fermentación depende de la cantidad de azúcares reductores presentes [2]. En un estudio realizado con *Agave tequilana* Weber [2], el contenido de azúcares reductores en las piñas crudas se encontró en el intervalo de 25 a 30%, el resultado para *Agave cocui* en el presente estudio fue de 34%, un poco por encima del valor promedio considerado para la buena calidad. No se realizaron estudios en las hojas ni en la piña cocida de *A.*

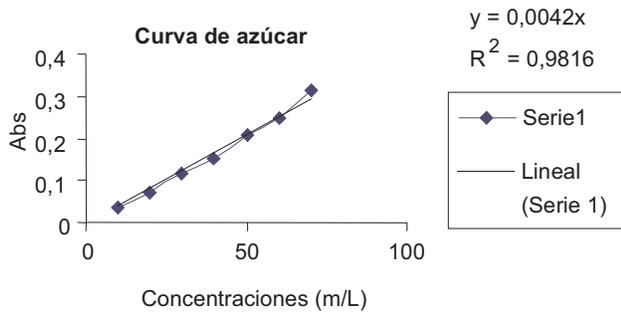


Figura 1. Curva para cuantificar los azúcares totales.

Tabla 1. Porcentaje promedio de azúcares totales.

Muestra	Porcentaje (%) promedio
Extracto de piña cruda	(79,1 ± 2,0)
Extracto de hoja	(47,3 ± 0,2)
Extracto de piña cocida	(84,6 ± 1,0)

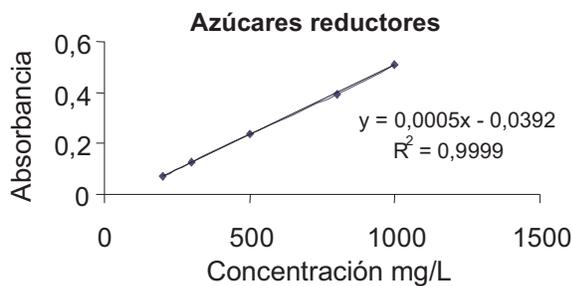


Figura 2. Curva para cuantificar azúcares reductores.

Tabla 2. Porcentaje promedio de azúcares reductores y no reductores

Muestra	Azúcares reductores (%)	Azúcares no reductores (%)
Extracto de piña cruda	(34,1 ± 10,0)	45,0
Extracto de hoja	(9,4 ± 2,0)	37,9
Extracto de piña cocida	(55,0 ± 2,0)	29,6

tequilana por lo que no pudo compararse. Otro estudio también con *Agave tequilana* Weber [17] más reciente, con el objetivo de obtener bioetanol, reporta para la piña cocida 80,35% de azúcares reductores, bastante alto si se compara con el encontrado en este estudio de 55,00%. Para el estudio con *A. tequilana* en este caso se controlaron todas las variables, especialmente la temperatura, y obviamente eso influye sobre un mayor rendimiento. En el caso de *A. cocui*, se utilizaron las piñas suministradas directamente por los productores de licor, sin controlar variables. Esto pudo haber influido sobre el rendimiento de los azúcares.

Determinación individual de azúcares

Para determinar los azúcares presentes en las muestras se analizaron los cromatogramas de las Figuras 3, 4 y 5 correspondientes a piña cruda, hoja y piña cocida respectivamente, se obtuvieron dos cromatogramas para cada muestra y se tomó el valor promedio de ambas como criterio de tiempo de retención. Por esa razón, los valores observados en los cromatogramas no son exactamente igual a los reportados. Para piña cruda, en la Figura 3, se observan tres picos cuyos tiempos de retención promedio son de: 5,975; 6,868 y 11,089 minutos, los cuales se pueden asignar a fructosa, glucosa y sacarosa respectivamente. Para las hojas, en la Figura 4, se observan cuatro picos: 5,693; 6,481; 9,871 y 17,238 minutos, que corresponderían a arabinosa, y manosa, los otros dos picos no se pueden asignar por lo tanto son azúcares sin identificar. Para la piña cocida, en la Figura 5, también se observan cuatro picos con tiempos de retención: 4,633; 5,707; 6,372 y 9,909 minutos, los cuales se pueden asignar a xilosa, arabinosa, manosa y un cuarto pico que no se puede asignar porque no se observa este tiempo de retención en ninguno de los patrones.

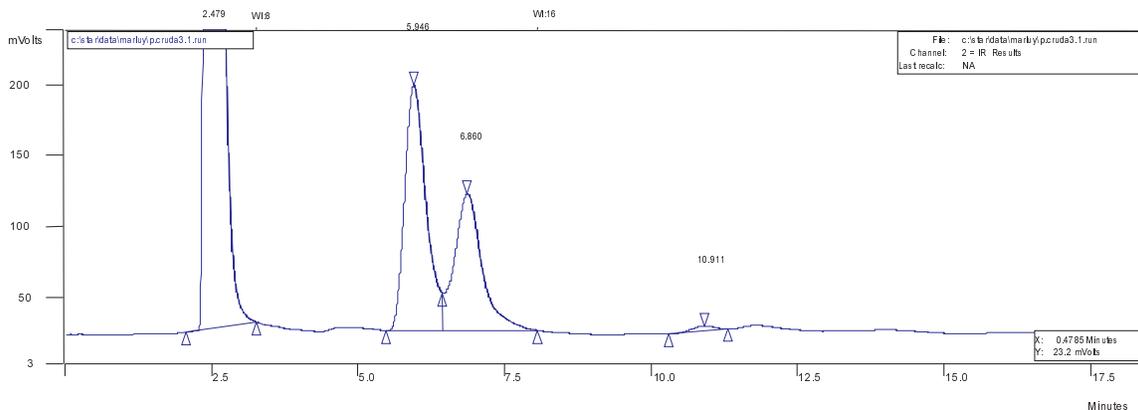


Figura 3. Cromatograma en la piña cruda, indicando los tiempos de retención de los azúcares.

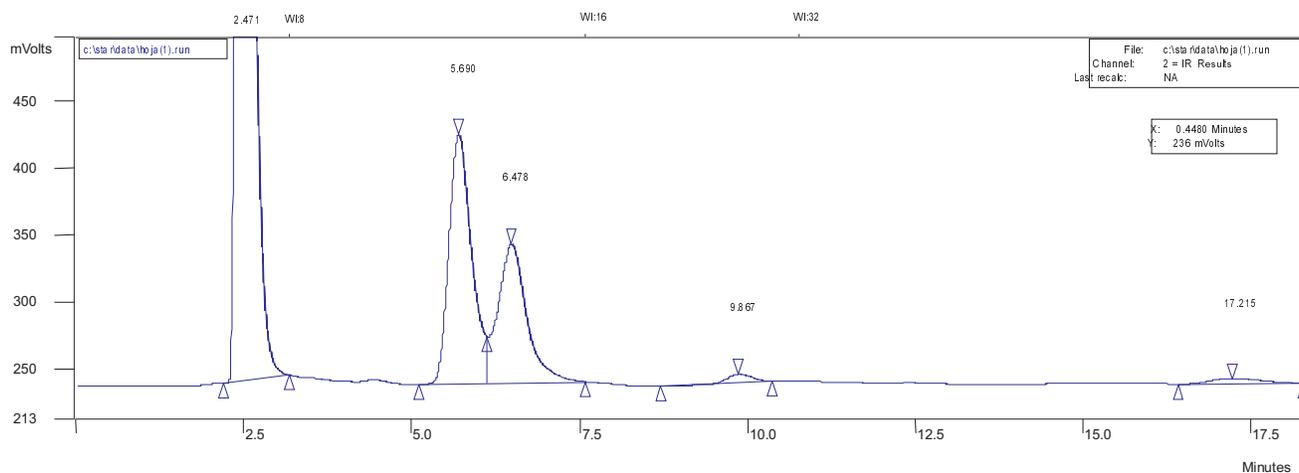


Figura 4. Cromatograma en la hoja, indicando los tiempos de retención de los azúcares.

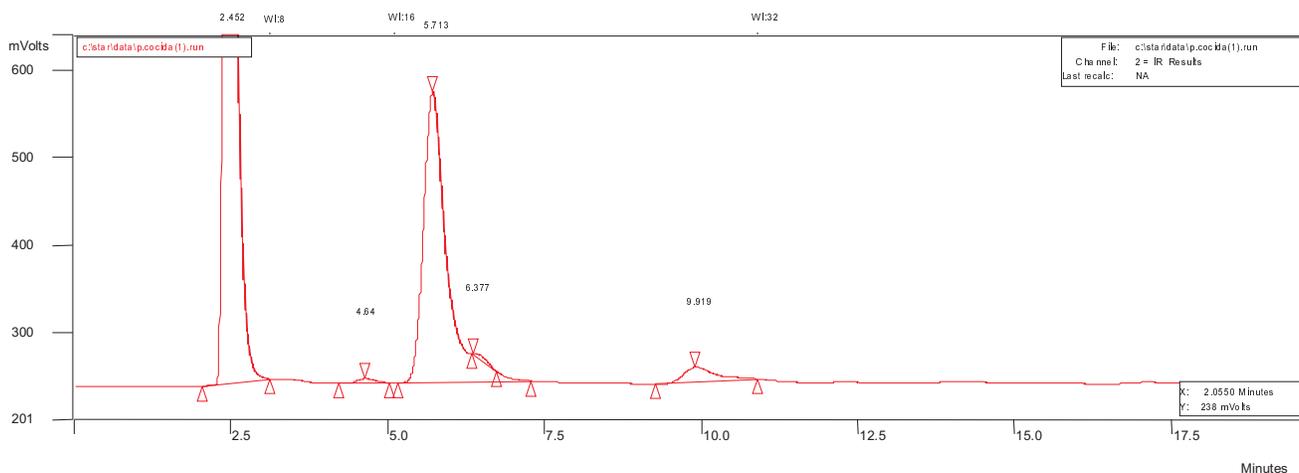


Figura 5. Cromatograma en la piña, cocida indicando los tiempos de retención de los azúcares.

Consideraciones finales

Se determinó la cantidad de azúcares totales, reductores y no reductores de las hojas, la piña cruda y cocida de *A. cocui*, además se identificaron los azúcares presentes. El contenido de azúcares reductores en *Agave cocui* indica que esta planta es promisoriosa para ser utilizada en la obtención de alcoholes que no sólo sirvan para preparar bebidas alcohólicas sino también con fines energéticos. Es importante tomar en cuenta que las plantas pertenecientes al género *Agave* son cultivos bioenergéticos potenciales de baja huella hídrica (consumo de agua), que pueden cultivarse en zonas semiáridas con escasa pluviosidad y además tienen un rendimiento energético bueno ya que la huella de carbono (emisiones de dióxido de carbono) también es baja [6].

Agradecimientos

Al FONACIT por el financiamiento a través del proyecto S1-2001001059. A la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda por el apoyo académico prestado.

Referencias

- [1] AVINASH, K. (2007). Biofuels applications as fuels for internal combustion engines. **Progress in Energy and Combustion Science**, 33 (3): 233-271.
- [2] BAUTISTA, M.; GARCÍA, L.; SALCEDO, R.; PARRA, L. (2001). Azúcares en Agaves (*Agave tequilana* Weber) cultivados en el estado de Guanajuato. **Acta Universitaria**. 11(001): 33-38.
- [3] BAUTISTA, M.; GARCÍA, L.; BARBOZA, J.; PARRA, L. (2001). El *Agave tequilana* Weber y la producción de tequila. **Acta Universitaria**. 11(002): 26-34.

- [4] CARO, M.; MARTÍNEZ, A.; SERRANO, L. (2009). Caracterización del bagazo de Agave. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Acapulco, Méjico.
- [5] CHIRINO, Wilmary (2005). Determinación de azúcares presentes en el mosto del *Agave cocui* mediante cromatografía de alta resolución. Trabajo especial de grado para optar al Título de Ingeniero Químico. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda.
- [6] DAVIS, S.; DOHLEMAN, F.; LONG, S. (2011) The global potential for Agave as a biofuel feedstock. **Global Change Biology: Bioenergy**. 3(1): 68-78.
- [7] DAVIS, S.; GRIFFITHS, H.; HOLTUM, J.; LARQUÉ, A.; LONG, S. (2011). The Evaluation of Feedstocks in GCBB Continues with a Special Issue on Agave for Bioenergy. **Global Change Biology: Bioenergy**. 3(1): 1-3.
- [8] DÍAZ, Mirian (2000). Programa *Agave cocui*. Fundacite Falcón pp. 24.
- [9] DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; ROBERS, P.A.; SMITH, F. (1956). Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. **Anal. Biochem.** 28: 350-356.
- [10] GONZÁLEZ-BATISTA, Carlos (2000). **Nota Histórica sobre los usos del *Agave cocui* en Falcón**. Centro de Investigaciones Históricas Pedro Manuel Arcaya. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Programa FIR. CONICIT. Fundacite Falcón. 26 Pp.
- [11] GRANADOS, S. (1993). **Los Agaves en Méjico**. Méjico: Universidad Autónoma de Chapingo. pp 112-113.
- [12] HERNÁNDEZ, Nelson (2008). Biocombustibles y otras Fuentes de Energía. Jornadas Nacionales "Pensar en Venezuela" Colegio de Ingenieros Caracas. (Documento en línea) Disponible: http://acading.org.ve/info/comunicacion/pubdocs/CIV/energia/6_Biocombustibles_y_otros_fuentes_de_energia_pdf (Consulta: 2012, abril 25)
- [13] HERRERA, M.; CASTRO, L.; HERRERA, J.; ANCONA, W.; AGUILAR, M.; ROBERT, M.; MIRANDA, M. (2004). Estudios sobre los fructanos de Henequen (*Agave fourcroydes* L). (Documento en línea). Disponible: www.fpy.org.mx/index.php?id=fructanosdelhenquen. (Consulta: 01/07/2010)
- [14] ÑIGUEZ, G.; DIAZ, R.; SAN JUAN, R.; ASNALDO, J.; ROWEL, R. (2001). Utilization of by-products from tequila industry. Part 2: Potencial value of *Agave tequilana* Weber azul leaves. **Bioresource Technology**. 77: 101-108.
- [15] MARTÍNEZ, J.; BARAHONA, F.; LAPPE, P.; COLUNGA, P.; MAGDUB, A.; VERGARA, S.; LARQUÉ, A. (2011). Ethanol Production from two varieties of henequén (*Agave fourcroydes* Lem) **Global Change Biology: Bioenergy**. 3(1): 37-42.
- [16] MILLER, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426-428.
- [17] MONTAÑEZ, J.; VICTORIA, J.; FLORES, R.; VIVAR, M. (2011) Fermentación de los fructanos del *Agave tequilana* Weber Azul por *Zymomonas mobilis* y *Sacharomyces cerevisiae* en la producción de bioetanol. **Información Tecnológica**. 22(6): 3-14.
- [18] MORALES, M. (1997) Caracterización General del Proceso de Producción de la Tequilera Corralejo S. A. de C.V. ubicada en el municipio de Pénjamo, Gto. Tesis Profesional. Universidad Autónoma de Chapingo pp. 5-22.
- [19] NOBEL, P. (1998). **Los Incomparables Agaves y Cactus**. Editorial Trillas. Méjico. pp. 56.
- [20] QUIROZ, M.; GÓMEZ, R. (1999). La producción de Mezcal en Oaxaca. **Bebidas Mexicanas**. 8(4): 12-17.
- [21] RENDON, L.; MAGDUB, M.; LARQUE, A. (2005). Producción de alcohol en piñas de Henequen (*Agave fourcroydes* Lem). (Documento en línea). Disponible: www.fpy.org.mx/index.php?id=piasdeheh. (Consulta: 01/07/2010).
- [22] SUÁREZ, Adrián (2011-2012) ¿Por qué las Energías Renovables? Petróleo YV. Año 13 Nº 46. (Documento en línea). Disponible: www.petroleoyv.com/website/uploads/PYV46%20WEB.pdf (Consulta 2012, abril 25)
- [23] TÉLLEZ, M. (1998). El conocimiento, una Etapa Importante en la Producción de Tequila. **Bebidas Mexicanas** 7(1): 19-20.
- [24] TORNEY, F.; MOELLER, L.; SCARPA, A.; WANG, K. (2007). Genetic engineering approaches to improve bioethanol production from maize. **Current opinion in Biotechnology**. 18(3): 193-199.
- [25] VICTORIA, J.; MONTAÑEZ, J.; FLORES, R. (2009). Aprovechamiento de azúcares de las pencas de *Agave tequilana* Weber var. Azul para la producción de bioetanol (primera parte). XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Acapulco, Méjico.