

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

---

MÉTODO SIMULTÁNEO DE SEPARACIÓN DE ALCOHOLES  
POR BURBUJEO DE AIRE Y SU CUANTIFICACIÓN POR  
REDUCCIÓN DEL DICROMATO.

TRABAJO ESCRITO EN LA MODALIDAD DE:  
**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO EN  
INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA**

PRESENTA:  
**MONTSERRAT ESCOBAR ROSALES**

DIRIGIDA POR:  
DR. EN C. MARÍA DEL CARMEN MONTES HORCASITAS  
M. EN C. CARLOS OROZCO ÁLVAREZ

Ciudad de México a 2 de Junio del 2017



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**AUTORIZACIÓN DE USO DE OBRA**

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
PRESENTE.**

Bajo protesta de decir la verdad el que suscribe **C. Montserrat Escobar Rosales** manifiesto ser autor (a) de la obra titulada: "**Método simultáneo de separación de alcoholes por burbujeo de aire y su cuantificación por reducción del dicromato**", en adelante "La Tesina", por lo que por medio del presente, con autorización de mi director interno, la **Dr. María del Carmen Montes Horcasitas** perteneciente al Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la ley federal del Derecho de Autor, otorgo al Instituto Politécnico Nacional, en adelante "El IPN", autorización no exclusiva para comunicarla y exhibirla públicamente, total o parcialmente, en medios digitales un año después de la fecha de la presente autorización.

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor en la obra.

Adicionalmente, y en mi calidad de autor de la obra, manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de "La Tesina" o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad, o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

Ciudad de México a 29 de Mayo del 2017

ATENTAMENTE

---

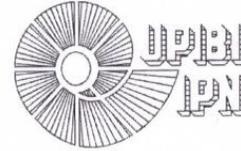
Dr. María del Carmen Montes Horcasitas  
Director interno

---

Montserrat Escobar Rosales  
Autora de "La Tesina"



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

**SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA**

**ACTA DE TRABAJO ESCRITO**

En la Ciudad de México el día 29 de mayo del 2017, siendo las 12:00 horas, se reunieron los integrantes de la Comisión de Evaluación para Opción Curricular con el fin de revisar el trabajo escrito titulado: "**Método simultáneo de separación de alcoholes por burbujeo de aire y su cuantificación por reducción del dicromato**" que presenta el alumno (a) **Escobar Rosales Montserrat** con número de boleta **2013620178**, aspirante a **Ingeniero en Biotecnología**.

Después de intercambiar opiniones los integrantes de la Comisión de Evaluación manifiestan **APROBAR EL TRABAJO ESCRITO**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes para la opción curricular de titulación.

**COMISIÓN REVISORA.**

Dr. Ma. Del Carmen Montes Horcasitas  
Director Externo

M. Carlos Orozco Álvarez  
Director Interno

M. en C. César Agustín Jiménez Sierra  
Evaluador 1

Dr. Luis Carlos Fernández Linares  
Evaluador 2

M. en C. Jonás Martínez Limón  
Jefe de Carrera de Ingeniería Biotecnológica

## **A MIS PADRES**

A mi mamá, por ser lo más importante en mi vida. He aquí mi manera de agradecerle todos los desvelos y los sacrificios que ha hecho detrás de esa máquina para que yo pueda estar bien y seguir mis sueños. Le agradezco por amarme como lo hace, por estar conmigo en la salud y en la enfermedad, tanto mía como de ella. Por la educación que he recibido de su parte, por enseñarme el significado de lo que implica ser mujer y de la importancia de la disciplina, constancia y la tenacidad en todo aquello que haga. Siempre será mi ejemplo a seguir y aunque sé que aún no estoy ni siquiera a la mitad del camino para convertirme en la grandiosa mujer que es, este trabajo es el primero de muchos en su honor que espero la vida me permita hacer y compartir a su lado.

A mi papá, por ser un apoyo incondicional tanto mío como de mi mamá.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dr. María del Carmen Montes Horcasitas, titular del “Laboratorio de Biocatálisis” del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, por confiar en mí y brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto con su equipo de trabajo.

Al Ing. Jesús Vega Estrada, por hacer interesante mi estancia en el laboratorio, por compartirme su experiencia en el campo, por brindarme consejos, pero sobre todo, por estar conmigo desde el inicio hasta el final de la elaboración del trabajo. Le agradezco su paciencia hacia conmigo y su tolerancia respecto a mis deficiencias académicas. Aprendí mucho a su lado.

Al M. en C. Fernando Grijalva Hernández, por permitirme colaborar con él desde mi llegada al laboratorio y por brindarme sus consejos y apoyo aún después de culminar el trabajo experimental a su lado. Aprendí y reforcé muchos conocimientos de mi carrera en su línea de investigación.

A la M. en C. Laura Jenitzia Noriega Medrano, porque pese a las dificultades que tuvimos en la fase experimental desde el inicio, siempre fue amable y me brindó apoyo para comprender en poco tiempo todo lo que implicaba este proyecto.

Al Dr. Luis Carlos Fernández Linares, por ser un excelente evaluador y por hacerme las correcciones pertinentes, a la brevedad, acorde a su experiencia. Fue un privilegio haber sido su alumna y aprender de sus observaciones minuciosas y muy acertadas.

Al M. Carlos Orozco Álvarez, por brindarme su tiempo para el ensayo de mi presentación. Por escucharme pacientemente cuando acudía con pánico y estrés a su cubículo para explicarle mis avances en el proyecto. Siempre supo cómo sacar lo mejor de mí y como motivarme desde que tomé clases con él, razón por la cual le pedí ser mi director interno. Le agradezco de corazón que haya aceptado serlo.

Al M. en C. César Jiménez Sierra, porque más que ser un profesor siempre se comportó como un amigo. Por todo el apoyo a lo largo de mi carrera. Por sus observaciones respecto a mi desempeño, por motivarme a seguir adelante y por ser un gran mentor.

Por último, pero no por ello menos importante, a mi gemelo el I.B.T Emmanuel Cervantes Monroy. Porque en poco tiempo se ha convertido en una persona muy importante en mi vida y el, después de mi familia, conoce todo lo que implicó culminar este proyecto. Le agradezco su apoyo y orientación dentro del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, así como su amistad y motivación en la redacción de esta tesina.

## INDICE

1. RESUMEN.....	11
2. INTRODUCCIÓN.....	12
3. MARCO TEÓRICO .....	14
3.1. Butanol .....	14
3.2. Obtención química del butanol.....	15
3.3. Obtención biológica del butanol.....	16
3.4. Microdifusión. ....	19
3.5. Dicromato de potasio y su reacción con alcoholes primarios. ....	20
3.6. <i>Gas stripping</i> . ....	20
4. JUSTIFICACIÓN.....	22
5. OBJETIVOS .....	23
5.1. Objetivo general. ....	23
5.2. Objetivos específicos.....	23
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	23
7. METODOLOGÍA.....	24
7.1. Reactivos.....	24
7.2. Adaptación del método para cuantificación de alcoholes por burbujeo de aire. .	24
7.2.1. Sistema de burbujeo para la determinación de alcoholes. ....	24
7.2.2. Establecimiento de las condiciones de operación del sistema de burbujeo por aire para determinación de alcoholes. ....	25
7.3. Validación y precisión del método.....	26
7.4. Comparación del método. Fermentación ABE con <i>Clostridium acetobutylicum</i> .	27
7.4.1. Microorganismo y fermentación ABE.....	27
7.4.2. Comparación del método de burbujeo por aire o <i>gas stripping</i> con la técnica de microdifusión.....	28
8. RESULTADOS .....	29

8.1.	Adaptación del método para cuantificación de alcoholes por burbujeo de aire. .	29
8.1.1.	Comparación de los sistemas de burbujeo. ....	29
8.1.2.	Efecto del flujo de aire sobre la reducción de dicromato en el sistema de burbujeo.....	29
8.1.3.	Efecto del tiempo de reacción sobre la reducción del dicromato en el sistema de burbujeo a diferentes cantidades de n-butanol.....	30
8.2.	Validación y precisión del método.....	31
8.2.1.	Evaluación de la linealidad del sistema.....	31
8.2.2.	Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).....	33
8.2.3.	Repetitividad de las mediciones.....	34
8.2.4.	Reproducibilidad de las mediciones.....	35
8.3.	Fermentación ABE y cuantificación de alcoholes presentes en las muestras por burbujeo con aire y microdifusión. ....	35
9.	DISCUSIÓN.....	36
9.1.	Adaptación del método para cuantificación de alcoholes por burbujeo de aire. .	36
9.1.1.	Comparación de los sistemas de burbujeo. ....	36
9.1.2.	Efecto del flujo de aire y del tiempo de reacción sobre la reducción del dicromato en el sistema de burbujeo. ....	36
9.2.	Validación y precisión del método.....	37
9.2.1.	Evaluación de la linealidad del sistema.....	37
9.2.2.	Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).....	38
9.2.3.	Repetitividad y reproducibilidad de las mediciones. ....	38
9.3.	Comparación del método de burbujeo de aire con la técnica de microdifusión. .	38
10.	CONCLUSIONES .....	39
11.	RECOMENDACIONES PARA TRABAJO FUTURO.....	39
12.	BIBLIOGRAFÍA .....	40

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físicas del butanol.....	14
Tabla 2. Propiedades de los combustibles: etanol, gasolina y butanol.....	15
Tabla 3. Comparación de las cuantificaciones realizadas en cada uno de los sistemas de burbujeo.....	29
Tabla 4. Absorbancias obtenidas a 450 nm con cada uno de los sistemas de burbujeo (A, B y C) para la curva tipo con la solución stock 2.....	32
Tabla 5. Obtención del límite de detección (LOD) y del límite de cuantificación (LOQ) del método de cuantificación de alcoholes por burbujeo de aire.....	33
Tabla 6. Evaluación de la repetitividad de las mediciones para la cuantificación de alcoholes por el método de burbujeo de aire y reducción del dicromato de potasio.....	34
Tabla 7. Reproducibilidad de las cuantificaciones con el método de burbujeo.....	35
Tabla 8. Cuantificación de alcoholes por microdifusión y por el método de burbujeo de aire.....	35

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntesis química de butanol. (a) Síntesis Oxo, (b) Proceso Reppe, (c) hidrogenación crotonaldeido. (Lee et al., 2008). .....	15
Figura 2. Clasificación de la medición de parámetros en un proceso (MEP Instruments, 2016). .....	18
Figura 3. Ensayo de microdifusión. A) Tapa de goma; B) Tubo externo (7 x1.5 cm); C) Tubo interno (4.5 x 0.9 cm); D) 0,5 mL de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> y muestra problema o curva de calibración; E) 1 mL K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> . (Noriega, et al., 2016).....	19
Figura 4. Etapas de la estrategia experimental .....	24
Figura 5. Sistema de burbujeo: A) Regulador de presión de aire (1 kg/cm <sup>2</sup> ) ; B) Rotámetro; C) Conector (14 cm); D) Aguja de acero inoxidable (14 cm); E) Tubbing de teflón needle 16, (Diámetro interno: 0.052 cm; diámetro externo: 0.076 cm); F) Tubo de vidrio (Altura: 15 cm; diámetro externo: 1.4 cm ; diámetro interno: 1.2 cm; volumen:16 cm <sup>3</sup> ); G) Frasco de vidrio (Diámetro:1.2 cm, altura: 3.5 cm) ; H) Muestra (5 mL de volumen de operación, conteniendo la muestra de alcoholes original o diluida); I) Dicromato de potasio (1 mL); J) Tapón de goma. ....	25
Figura 6. Evaluación de diferentes flujos de aire en cada sistema (A, B y C) diseñado para la cuantificación de alcoholes. La curva [0] representa la reducción que tiene el dicromato	

de potasio a cada flujo de aire sin la presencia de alcohol. No sería más adecuado usar una línea con la ds..... 29

Figura 7. Efecto del tiempo de reacción a diferentes cantidades de n-butanol..... 30

Figura 8. Efecto del tiempo a 8, 9 y 10 minutos sobre la reducción del dicromato de potasio de 0 a 10 mg de n-butanol. .... 31

Figura 9. Linealidad de la reducción del dicromato de potasio con la solución stock 2. La cantidad de alcohol en  $\mu\text{moles}$  representa la suma de los moles de butanol más los de etanol..... 32

Figura 10. Curva tipo con solución stock 2 con cada uno de los sistemas de burbujeo (A, B y C)..... 33

## 1. RESUMEN

Un método económico, simple, semicuantitativo y rápido para la cuantificación de alcoholes en muestras de fermentación aceto-butílica-etílica o fermentación acetona-butanol-etanol (ABE) por *Clostridium acetobutylicum* 824 ATCC fue diseñado cambiando la técnica de microdifusión por el burbujeo de aire para acelerar la reducción del dicromato de potasio en medio ácido.

Este método, basado en la oxidación de alcoholes de cadena lineal usando dicromato de potasio en medio ácido con detección posterior mediante espectrofotometría a 450 nm, fue primeramente estandarizado usando una solución stock 1 que contenía 10 g/L de n-butanol. Variando los flujos de aire (44.81, 89.62, 134.42, 161.31, 179.23 y 197.15 mL/min) con un volumen de operación fijo de 5 mL y el tiempo de reacción (de 0 a 10 minutos) a diferentes cantidades del analito (10, 30 y 50 mg de n-butanol) se consiguió tener un comportamiento lineal de 0 a 10 mg de n-butanol con un flujo de aire de 179.23 mL/min durante 10 minutos.

Como parte de la validación del método, se simuló con una solución stock 2 (10 g/L de n-butanol, 4 g/L de acetona y 1 g/L de etanol) una muestra de fermentación acetona-butanol-etanol en matriz limpia. Con la solución stock 2 se observó que las determinaciones de 0 a 7 mg de n-butanol presentan un comportamiento lineal con un coeficiente de correlación de 0.9916. La precisión del método fue evaluada a través de la repetitividad y la reproducibilidad de las cuantificaciones: diez veces en el mismo día y en diferentes días, respectivamente. El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) obtenidos para este método fueron 0.021 mg/mL y 0.061 mg/mL, respectivamente.

El método propuesto fue aplicado en la cuantificación de alcoholes en muestras de fermentación acetona-butanol-etanol. Se observó que es capaz de cuantificar cantidades de alcohol muy cercanas a las obtenidas por microdifusión en menor tiempo (10 minutos, sin necesidad de centrifugar la muestra). Esta última ventaja permite dar por terminada una fermentación acetona-butanol-etanol en cuanto se detecte que ya no hay incremento en la producción de butanol.

## 2. INTRODUCCIÓN

La energía es el corazón de muchos problemas críticos en materia económica, ambiental y de desarrollo. Los desafíos que aquejan a la comunidad global y a los gobiernos de todas las naciones relacionados con la seguridad energética, el cambio climático, el impacto a la salud y la pobreza, hacen que sea urgente que el sector energético sea ecológico (Singh, 2017).

En la actualidad, la principal fuente de energía utilizada por el ser humano son los combustibles fósiles no renovables (petróleo, carbón, gas natural y gas licuado del petróleo). Se cree que el uso continuo de éstos al ritmo actual aumenta el calentamiento global y causa un cambio climático más severo. Aunado a ello, se debe hacer frente a su inminente agotamiento y al incremento en su precio. En contraste, las fuentes de energía renovables permiten reemplazar a los combustibles convencionales en cuatro áreas distintas: generación de electricidad, calefacción y/o refrigeración de aire y agua, combustibles para motores y servicios de energía rural (Singh, 2017). Una alternativa potencial a la gasolina o al diésel son los biocombustibles (bioetanol, biodiésel y biobutanol) debido a sus características de combustión y al rendimiento de la máquina (Jin et al., 2011).

La Biotecnología como disciplina, desde su nacimiento, se ha consolidado como una herramienta prometedora que pretende ofrecer soluciones en el sector médico (Biotecnología roja), agrícola (Biotecnología verde), industrial (Biotecnología blanca), marino (Biotecnología azul) y ambiental (Biotecnología gris) (Gupta, et al., 2017). Es en éste último sector donde la bioenergía, una forma de energía renovable a partir de la conversión de biomasa a través de fermentaciones, permite la producción de biocombustibles a partir de subproductos agrícolas.

La producción de butanol por fermentación aceto-butílica-etílica o fermentación acetona-butanol-etanol (ABE) a partir de cultivos anaerobios descubiertos por Pasteur en 1861, prosperó a principios del siglo XX y se convirtió en el segundo proceso fermentativo industrial más grande en el mundo después del etanol (Lee, et. al., 2008). Es importante destacar que el butanol, en comparación con el etanol, es superior como combustible por diversas razones: tiene un contenido energético superior, tiene una menor volatilidad, es menos higroscópico y es menos corrosivo (Dürre, 2007). Para 1945, dos tercios del butanol empleado industrialmente eran producidos por fermentación en los Estados Unidos de América. Se estima que se obtienen 1.1 mil millones de USD por año por la venta de n-

butanol a su precio actual (Gírio et al., 2017). Su producción se ha proyectado con una expansión del 3% por año (Kirschner, 2006). En Rusia la industria de la fermentación se ha concentrado principalmente en la conversión de biomasa proveniente de residuos agrícolas en butanol (Zverlov et al., 2006).

Por todo lo anterior, el interés en producir butanol por fermentación ha incrementado como una alternativa renovable al petróleo (Lee et al., 2008; Singh y Singh, 2011). Sin embargo, problemáticas asociadas a los efectos citotóxicos de los solventes producidos y la naturaleza bifásica de la cepa empleada contribuyen a que este proceso aún esté alejado de ser la solución ideal. Esta primer problemática hace que resulte necesario monitorear y controlar la concentración de dichos solventes en el medio de cultivo. Se han desarrollado varios métodos de detección y cuantificación de alcoholes basados en la reacción química de estos con el dicromato de potasio en medio ácido pero la obtención de resultados continúa siendo un proceso tardado. Es por ello que en el presente trabajo se pretende reducir el tiempo de análisis para la cuantificación de alcoholes en muestras de fermentación ABE aprovechando el principio de *gas stripping* o burbujeo de aire. Con esta modificación se espera dar una alternativa potencial para la detección y cuantificación de alcoholes *on-line*.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Butanol

El butanol (IUPAC 1-butanol) es un alcohol primario de cuatro carbonos que tiene por fórmula  $C_4H_9OH$ . Su peso molecular es de 74.12 g/mol. Es un líquido incoloro con un olor característico y sus vapores poseen tanto un efecto irritante en las membranas mucosas como un efecto narcótico en altas concentraciones (Lee et al., 2008). Es completamente miscible en solventes orgánicos y parcialmente miscible en agua. Algunas de sus características se pueden observar en la Tabla 1.

*Tabla 1. Propiedades físicas del butanol.*

Propiedad	Valor
Punto de Fusión	-89.3 °C
Punto de Ebullición	117.7 °C
Temperatura de ignición	35 °C
Punto de inflamación	365 °C
Densidad a 20 °C	0.8098 g/mL
Presión crítica	48.4 hPa
Temperatura Crítica	287 °C
Densidad relativa	0.811 (20 °C)
Viscosidad, dinámica	2.9 mPa.s (20 °C)
Solubilidad en agua	77 g/L (20 °C)
Solubilidad (cualitativo)	Soluble
Disolvente(s)	disolventes orgánicos

(Lee et al., 2008)

El butanol puede ser usado como sustituto de los derivados del petróleo y tiene ventajas sobre otros biocombustibles como el etanol. El butanol posee una mayor densidad de energía, una presión de vapor menor, lo que lo hace más seguro su manejo y es menos corrosivo. Además el butanol puede ser mezclado con la gasolina en cualquier proporción y puede reemplazarla sin realizar modificación alguna en los motores de los automóviles (Qureshi & Blaschek, 1999). La comparación del butanol como combustible con respecto al etanol y a la gasolina se muestra a continuación (Tabla 2).

Tabla 2. Propiedades de los combustibles: etanol, gasolina y butanol.

	Butanol	Gasolina	Etanol
Densidad de energía (MJ/L)	29.2	32	19.6
Proporción aire-combustible	11.2	14.6	9
Calor de vaporización (MJ/Kg)	0.43	0.36	0.92
Número de octanos en investigación	96	91-96	0.129
Número de octanos en motor	78	81-89	102

(Lee et al., 2008)

A nivel industrial, el butanol es un compuesto químico con diversas aplicaciones. Casi la mitad del mismo es producido en forma de butil acrilato o ésteres de metacrilato para ser empleado en el recubrimiento de látex, esmaltes y lacas (Kirschner, 2006). Otros derivados importantes son el butil glicol, empleado como solvente para limpiar recubrimientos; el butil acetato usado en pinturas y saborizantes sintéticos; y la butilamina, utilizada en producción de pesticidas, medicinas, emulsificantes y como precursora de plastificantes.

### 3.2. Obtención química del butanol.

La obtención química del butanol puede realizarse por tres métodos: síntesis oxo, síntesis reppe e hidrogenación crotonaldehído. (Figura 1).

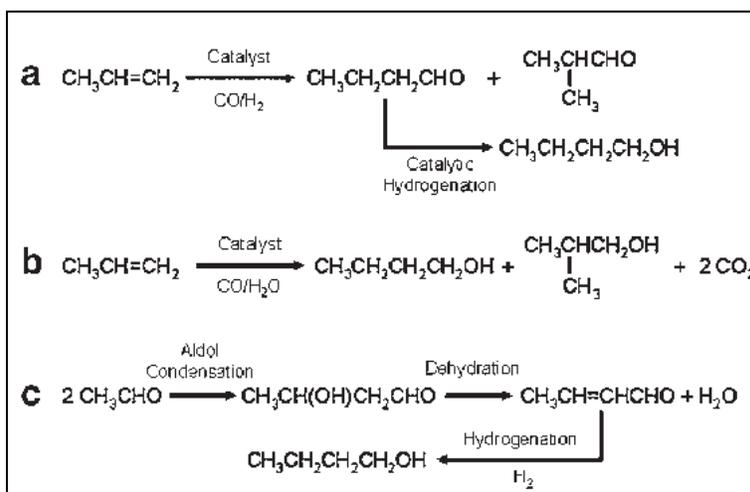


Figura 1. Síntesis química de butanol. (a) Síntesis Oxo, (b) Proceso Reppe, (c) hidrogenación crotonaldehído. (Lee et al., 2008).

### 3.3. Obtención biológica del butanol.

El butanol, la acetona, el etanol y el isopropanol, son producidos de forma natural por el género *Clostridium*. Las especies productoras principales son: *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharobutylicum* y *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Dürre, 2005).

*Clostridium* es un bacilo Gram positivo anaerobio estricto. Puede asimilar una gran variedad de sustratos, desde monosacáridos (pentosas, hexosas) hasta polisacáridos (Jones y Woods, 1986). Para su crecimiento, es necesario suministrar en el medio de cultivo fuentes de nitrógeno complejas como el extracto de levadura (Monot et al., 1982).

La fermentación de este microorganismo es bifásica. La transición entre una fase y otra es el resultado de un cambio dramático en el patrón de expresión genética (Dürre et al., 1987).

La primera fase, también llamada fase acidogénica, ocurre principalmente durante la etapa exponencial (Andersch et al, 1983; Hartmanis y Gatenbeck, 1984) y es caracterizada por la producción de acetato, butirato, hidrógeno y dióxido de carbono, principalmente. La segunda fase, también llamada fase solvetogénica, ocurre durante la etapa estacionaria. En ella, los ácidos son reasimilados para ser empleados en la producción de acetona, butanol y etanol. Esta fase está muy ligada a la esporulación (Paredes, et al. 2005).

Un pH bajo (4.5) es requisito para la producción de solventes (Kim et al., 1984). La concentración de éstos últimos en una fermentación clásica en lote va de 12 a 20 g/L empleándose una cepa silvestre. El metabolismo de *Clostridium* se detiene a una concentración de solventes igual o superior a 20 g/L (Woods, 1995). El butanol, al ser un solvente lipofílico, causa un desorden entre los componentes de la capa fosfolipídica de la membrana celular, incrementando su fluidez (Bowles and Ellefson, 1985). Esta inestabilidad provoca alteraciones en el funcionamiento de varios sistemas de transporte. Según reportes de Moreira et al. 1981, a concentraciones de 0.1 a 0.15 M (7.41 a 11.12 g/L) de butanol, se tiene un 50% de inhibición en el crecimiento bacteriano y en el consumo de sustrato al verse afectada la actividad de la ATPasa. En contraste, se requieren niveles superiores a los 40 g/L de acetona o etanol para ocasionar el mismo efecto (Jones y Woods, 1986).

Aunque el butanol es un biocombustible prometedor, su producción convencional por cultivo en lote es limitada por los efectos citotóxicos y la naturaleza bifásica de la cepa empleada. Para combatir dicho problema y facilitar las fermentaciones en cultivos semicontinuos, la

remoción *in situ* del butanol ha probado ser una alternativa efectiva. Numerosos bioprocesos han sido acoplados con diversos sistemas de recuperación que emplean como base: a) el principio de extracción con solventes o extracción líquido-líquido (Barton & Daugulis, 1992): por adición directa del solvente, por recirculación a través de un extractor de solventes externo y por perstracción; b) la adsorción (Nielsen & Prather, 2009): por adición directa del adsorbente, por adsorción en lecho fijo y por adsorción en lecho expandido; o c) la vaporización (Groot et al., 1989): por *gas stripping*, *vacuum stripping* o eliminación al vacío y por pervaporación (Matsumura et al., 1988; Staggs & Nielsen, 2015).

Durante la fermentación ABE muchos parámetros son monitoreados y/o controlados; a) *In-line*; b) *Off-line*; c) *At line*; y d) *On-line*. La diferencia en ésta clasificación radica, en su mayoría, en el tiempo que se emplea para la obtención de resultados (Figura 2).

De esta manera, las mediciones *in-line* son aquellas cuyos resultados se obtienen directamente en el proceso, es decir, en el fermentador, tales como pH, temperatura, agitación, presión, densidad celular y el flujo de nitrógeno. El resultado es instantáneo.

Las mediciones *off-line* son realizadas por equipo ubicado en un ambiente completamente controlado y alejado de la zona de proceso. Generalmente es necesaria la toma de muestra para los ensayos. Pese a que éstos últimos pueden requerir técnicas analíticas específicas, la relación horas-hombre para completarlos los colocan como los más tardados (> 60 minutos).

En los análisis *at-line* la obtención de resultados es de aproximadamente 30 minutos.

Finalmente, las mediciones *on-line* arrojan resultados en 5 a 10 minutos. Se realizan específicamente para muestras cuyos resultados son críticos para el proceso. Permiten obtener resultados con un alto nivel de consistencia y certeza sin intervención humana e incrementan la seguridad del operador al no tener que recolectar muestras que pueden resultar tóxicas.

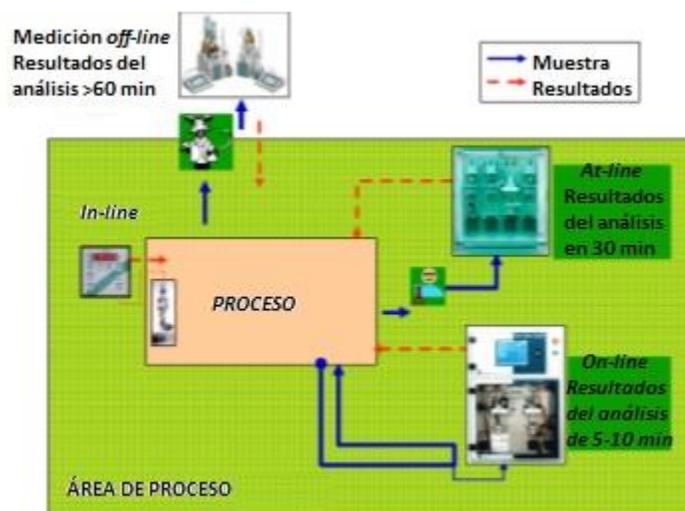


Figura 2. Clasificación de la medición de parámetros en un proceso (MEP Instruments, 2016).

La mayoría de los productos del metabolismo son usualmente medidos *off-line* al finalizar la fermentación. Estos análisis manuales arrojan resultados en tiempos prolongados y no permiten tener un control adecuado de las concentraciones en tiempo real. Además de ello, los análisis *off-line* pueden ser inadecuados para observar efectos transitorios en los cultivos debido a una frecuencia de muestra insuficiente o porque al no separar las células del medio de cultivo con suficiente rapidez, originan la degradación de la misma. Por todo lo anterior, resulta necesario un analizador rápido *on-line* acoplado con algunos medios que proporcione una corriente de muestra sin partículas representativas (Forman et al., 1991).

La cuantificación de alcoholes en fermentaciones tipo ABE es comúnmente realizada *off-line* usando el método de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés) (Buday et al., 1990; Tsuey et al., 2006). También es realizada *off-line* mediante la captación del butanol en forma de gas de salida o monitoreando directamente por cromatografía de gases a través de adaptaciones en el biorreactor. Sin embargo estos métodos son costosos y lentos.

Esta determinación también se realiza con kits basados en reacciones enzimáticas con una subsecuente detección espectrofotométrica por medio de un colorante (Fu, 2009; Ehrlich et al., 2002) y recientemente por microdifusión.

### 3.4. Microdifusión.

Esta técnica aprovecha la volatilidad que poseen los alcoholes a altas temperaturas. Si una sustancia volátil y un solvente puro se mantienen en compartimentos separados pero en contacto con la misma atmósfera, este primero tenderá a disolverse en el segundo. Ello implica una difusión del soluto (alcohol presente) desde la solución original (más concentrada) al solvente empleado (menos concentrado). Este proceso generalmente ocurre hasta que se alcanza el equilibrio, pero cuando se hace uso de una sustancia que es capaz de convertir al soluto volátil en no volátil, la difusión ocurrirá hasta que la presión de vapor en la atmósfera compartida tienda a cero (Fernández, J, 1956). De este modo, la microdifusión puede conseguir el aislamiento y detección del alcohol haciendo uso de la cámara de Conway. Esta cámara consiste en un dispositivo que tiene dos compartimientos que son circulares y concéntricos. La muestra que se desea analizar se coloca en el compartimiento externo (B) acompañado del agente liberante (D) (que puede ser  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  o  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) y el reactivo absorbente (E) en el compartimiento interno (C) (generalmente  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). El cierre de la cámara es hermético (A) (Serrano & Vélez, 2011) (Figura 3). La cámara se somete a un incremento de temperatura para aumentar la presión de vapor del alcohol y reducir el tiempo de la microdifusión, ya que la difusión completa es función de la presión de vapor del producto volátil, el volumen de la solución donde se difunde, el adsorbente utilizado, el cierre hermético y el tamaño de la cámara. El tiempo que dura este método es de alrededor 100 minutos, una vez tomada la muestra.

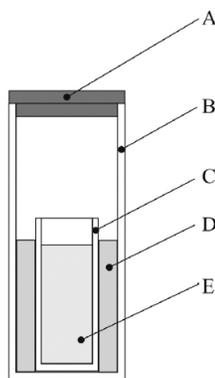


Figura 3. Ensayo de microdifusión. A) Tapa de goma; B) Tubo externo (7 x 1.5 cm); C) Tubo interno (4.5 x 0.9 cm); D) 0,5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y muestra problema o curva de calibración; E) 1 mL  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ . (Noriega. et al.. 2016).

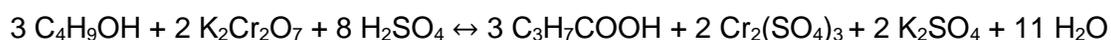
La microdifusión es una técnica económica, simple, semicuantitativa para butanol, permite evaluar varias muestras al mismo tiempo y puede ser usada para minimizar el número de

muestras que deben ser procesadas por cromatografía de gases, disminuyendo el tiempo y el costo del ensayo (Noriega et al., 2016).

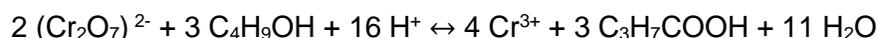
### 3.5. Dicromato de potasio y su reacción con alcoholes primarios.

La oxidación de alcoholes puede llevarse a cabo mediante combustión con oxígeno o a través de una reacción química con oxidantes como el dicromato de potasio VI ( $K_2Cr_2O_7$ ) disuelto en  $H_2SO_4$ . En este último caso, la reacción es específica a la clase de alcohol presente. Empleándose alcoholes primarios se obtienen aldehídos y ácidos carboxílicos; con alcoholes secundarios, cetonas; y los alcoholes terciarios no reaccionan (Clungston et al., 2000).

El butanol es un alcohol primario y por lo tanto su oxidación completa produce ácido butírico. Debe usarse un exceso del agente oxidante para garantizar la conversión completa del alcohol en ácido. La reacción de oxidación del butanol es la siguiente (Doria, 2009):



Vista de otra forma (Connors, 1981):



Durante esta reacción, el ion cromo VI (de color amarillo) reacciona con el alcohol primario, reduciéndose a cromo III y produciendo un color verde azulado que cumple la ley de Beer. Para esta reacción colorimétrica, la cantidad de luz absorbida a los 450 nm es directamente proporcional a la cantidad de dicromato de potasio presente e inversamente proporcional a la concentración de alcoholes primarios oxidados.

### 3.6. Gas stripping.

La aplicación de técnicas de recuperación *in situ* capaces de remover el butanol producido durante una fermentación ABE, parece ser la solución más viable a los problemas que caracterizan a este tipo de fermentaciones y para incrementar la rentabilidad del proceso (Ezeji et al., 2005).

La técnica de *gas stripping* emplea la diferencias de volatilidad entre los componentes de una mezcla. La eficiencia de la separación es gobernada por la ley de la constante de Henry (Alley, 2007). Posee muchas ventajas en comparación con las otras tecnologías: a) es simple de operar y de escalar; b) no requiere de equipo y químicos costosos; c) no remueve

los nutrientes e intermediarios de la reacción del medio de cultivo; y d) no es dañino para las células (Ezeji et al., 2003). Puede ser realizada ya sea burbujeando el gas a través del fermentador o en una columna externa (Groot et al., 1989; Ezeji et al., 2003). En ambas, se hace pasar un gas inerte por el seno del medio de cultivo, capturando los solventes. Esta corriente es posteriormente transportada a un intercambiador de calor, en donde los solventes se condensan y el gas puede ser reciclado para ser nuevamente burbujeado. Se puede emplear nitrógeno o los mismos gases producto de la fermentación ( $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$ ) (Groot et al., 1989; Ezeji et al., 2003); únicamente debe prestarse atención en su uso ya que el  $\text{CO}_2$  puede solubilizarse en el medio de cultivo y disminuir el pH, un parámetro que juega un papel clave durante una fermentación ABE (Maddox, 1989; Dahlbom, 2011).

Se ha visto que la aplicación de la técnica de *gas stripping* permite el uso de soluciones concentradas de azúcares en el fermentador (Qureshi & Blaschek, 2001), una mayor utilización de los mismos durante la fermentación y la reducción de la inhibición por butanol (Maddox & Qureshi, 1998). Esto permite reducir el volumen procesado. Como desventaja se tiene que usualmente remueve una gran cantidad de agua junto con el butanol y requiere de una mayor energía de entrada debido a su poca selectividad en contraste con las otras técnicas de separación (Oudshoorn et al., 2009; Qureshi et al., 2005; Vane, 2008). Sin embargo, algunos autores (Xue et al., 2013) han comprobado experimentalmente que es posible obtener una fase orgánica rica en butanol en el condensador que disminuye considerablemente los gastos subsecuentes de purificación.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

El inminente agotamiento de las fuentes de energía no renovables más empleadas por el ser humano, como el caso de los combustibles fósiles, ha generado una preocupación notable dentro del sector energético en la búsqueda de alternativas potenciales a los mismos y que además de ello, sean rentables.

Los biocombustibles como el bioetanol, biodiesel y el biobutanol han demostrado ser una posible solución a la preocupación anteriormente mencionada. La urgencia de lograr que la obtención de fuentes energéticas sea más ecológica, ha permitido el auge de procesos biotecnológicos como las fermentaciones a partir de subproductos agrícolas. Ejemplo de ello es la producción de biobutanol por fermentaciones tipo ABE por el género *Clostridium*, el segundo proceso fermentativo industrial más grande del mundo. Sin embargo, existen diversas problemáticas asociadas a la producción de biobutanol por esta vía, hecho que mantiene a este proceso aún alejado de ser la solución ideal. Entre ellos se encuentran los efectos citotóxicos de los solventes producidos y la naturaleza bifásica de la cepa empleada que evidentemente contribuyen a una productividad y rendimiento bajos. Esta primera problemática hace que resulte necesario monitorear y controlar la concentración de dichos solventes en el medio de cultivo.

Se han desarrollado varios métodos de detección y cuantificación de alcoholes basados en la reacción química de estos con el dicromato de potasio en medio ácido. Durante esta reacción, el dicromato es reducido produciendo un cambio de coloración (de naranja a amarillo) dependiendo de la cantidad de alcoholes de cadena lineal corta presentes. Referente a esto último, se han realizado adaptaciones que favorecen la detección de butanol y etanol en proceso de fermentación ABE, tales como el método de microdifusión empleando cámaras de Conway (Conway & Malley, 1942) evaluando diferentes temperaturas y tiempos de reacción (Noriega-Medrano et al., 2016).

Sin embargo, con todas las ventajas que el método de microdifusión representa y pese a que pueden analizarse varias muestras de forma simultánea, obtener la concentración de alcoholes en las mismas continúa siendo un proceso tardado (alrededor de 100 minutos una vez tomada la muestra). Es por ello que en este trabajo se pretende reducir el tiempo de análisis para la cuantificación de alcoholes en muestras de fermentación ABE aprovechando el principio de *gas stripping* o burbujeo de aire. De esta manera se van a capturar, por arrastre, los alcoholes presentes en una muestra de fermentación ABE y la

corriente de aire, junto con los alcoholes, se hace incidir en el seno de la solución ácida de dicromato de potasio para su detección y posterior cuantificación. Con esta modificación se espera dar una alternativa potencial para la detección y cuantificación de alcoholes *on-line*. Para comprobar la validez del método, se determinó la linealidad, la reproducibilidad y la repetitividad de las mediciones así como la selectividad y el límite de cuantificación y detección propias del método.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general.

Reducir el tiempo de análisis para la cuantificación de alcoholes en muestras de fermentación ABE por *Clostridium acetobutylicum* 824 ATCC cambiando la técnica de microdifusión desarrollada por Noriega et al., 2016 por el burbujeo de aire para acelerar la reducción del dicromato de potasio.

### 5.2. Objetivos específicos.

- 5.2.1. Establecer las condiciones de operación de un sistema diseñado para la cuantificación de alcoholes por burbujeo de aire y reducción con dicromato de potasio.
- 5.2.2. Validar el método de cuantificación de alcoholes por burbujeo de aire y reducción con dicromato de potasio.
- 5.2.3. Cuantificar la concentración de alcoholes en fermentaciones ABE por *Clostridium acetobutylicum* 824 ATCC por el método de burbujeo con aire y comparar los resultados obtenidos con los de la técnica de microdifusión desarrollada por Noriega et al., 2016 mediante el error de correlación entre ambos métodos.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El desarrollo de la fase experimental consistió en tres etapas, mismas que se describen a continuación (Figura 4).

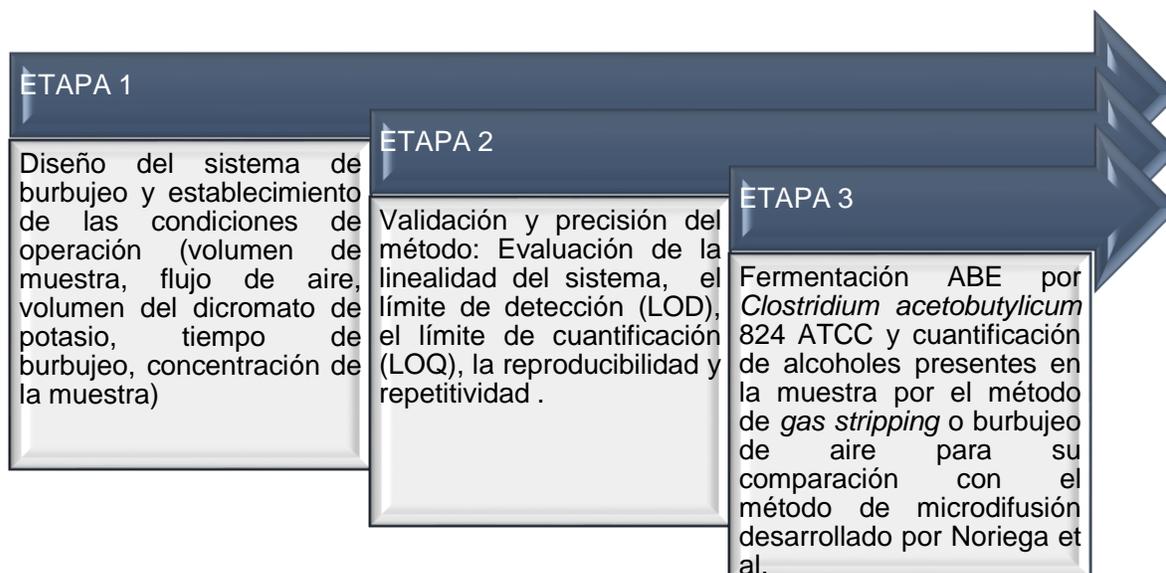


Figura 4. Etapas de la estrategia experimental

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico: acetona (99.5%) y etanol (99.5%) de Tecsiquim (Toluca, México); n-butanol (99.8%) de Baker analyzed (Berlín, Alemania). El H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fue obtenido de Merck (Berlin, Alemania) y el K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> de Mallinckrodt (Dublin, Irlanda). Se empleó agua destilada para la preparación de las soluciones.

### 7.2. Adaptación del método para cuantificación de alcoholes por burbujeo de aire.

#### 7.2.1. Sistema de burbujeo para la determinación de alcoholes.

Para la determinación de alcoholes se diseñó un sistema tal como se describe en la Figura 5. Con la finalidad de realizar las determinaciones de manera consecutiva, es decir, para evitar la pérdida de tiempo y/o posibles interferencias asociadas a un lavado y secado deficientes, se diseñaron tres sistemas iguales. A cada uno de ellos se le asignó una letra: A, B y C, respectivamente. Sin embargo, para asegurar que las condiciones en todos ellos son tales que permiten descartar errores asociados al equipo, las cuantificaciones fueron realizadas en cada uno de los sistemas y comparadas para su uso en el método propuesto.

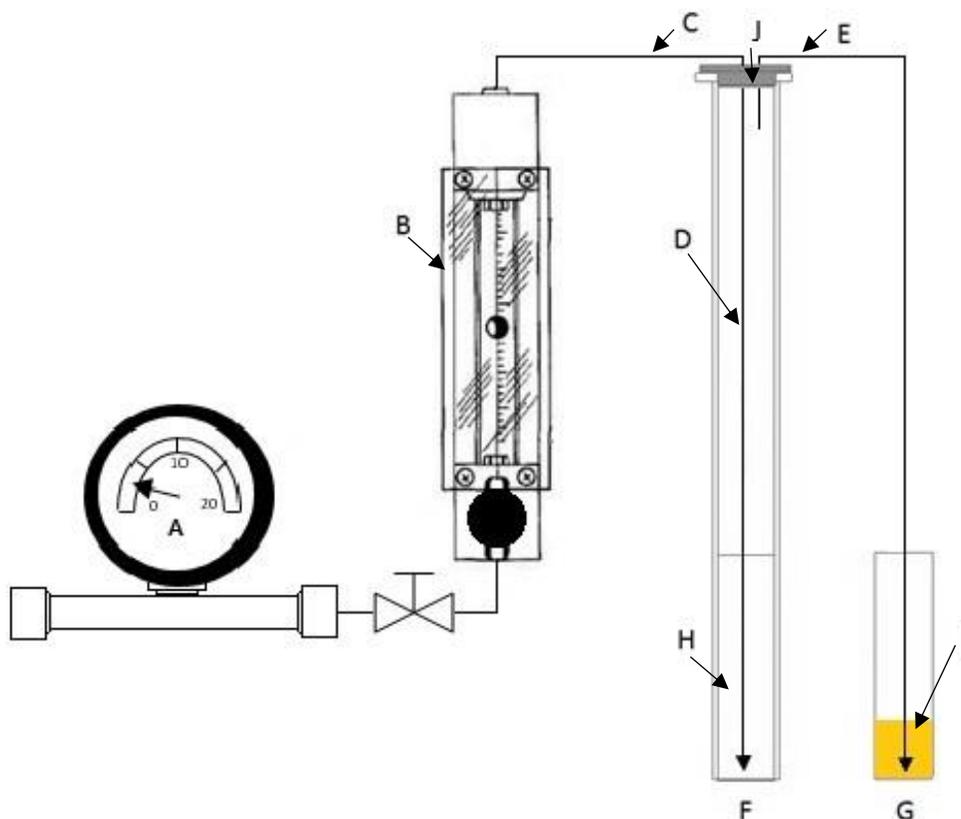


Figura 5. Sistema de burbujeo: A) Regulador de presión de aire (1 kg/cm<sup>2</sup>) ; B) Rotámetro; C) Conector (14 cm); D) Aguja de acero inoxidable (14 cm); E) Tubo de teflón 16, (Diámetro interno: 0.052 cm; diámetro externo: 0.076 cm); F) Tubo de vidrio (Altura: 15 cm; diámetro externo: 1.4 cm ; diámetro interno: 1.2 cm; volumen:16 cm<sup>3</sup>); G) Frasco de vidrio (Diámetro:1.2 cm, altura: 3.5 cm) ; H) Muestra (5 mL de volumen de operación, conteniendo la muestra de alcoholes original o diluida); I) Dicromato de potasio (1 mL); J) Tapón de goma.

### 7.2.2. Establecimiento de las condiciones de operación del sistema de burbujeo por aire para determinación de alcoholes.

Los tres sistemas de burbujeo (A, B y C), con un volumen de operación de 5 mL conteniendo 10 mg de n-butanol (equivalente a una concentración de 2 g/L) se evaluaron a diferentes flujos de aire: 44.81, 89.62, 134.42, 161.31, 179.23 y 197.15 mL/min durante 10 minutos. De esta forma se midió el arrastre de los compuestos orgánicos volátiles contenidos.

Con el flujo y volumen de operación previamente establecidos, se evaluaron diferentes concentraciones (2, 6 y 10 g/L de n-butanol, es decir, 10, 30 y 50 mg de n-butanol) a distintos tiempos de reacción (0 a 10 minutos).

En todos estos experimentos, para la separación de alcoholes, se burbujeó la corriente de aire mediante el conector (C) dentro de la matriz que contiene el alcohol propio de la fermentación (H). El gas de salida que circula por el tubo de teflón (E) se hizo reaccionar con 1 mL de la solución de dicromato de potasio en medio ácido (0.145 g de  $K_2Cr_2O_7$  en 100 mL  $H_2SO_4$  10 N) (I). El burbujeo de aire y la detección de alcoholes con el dicromato de potasio se llevaron a cabo de forma simultánea, con el volumen de operación y el flujo de aire previamente establecidos. Para medir la reducción del dicromato por decoloración de la solución ácida, pasado el tiempo de reacción se retiró el frasco de vidrio (G), se le añadió 1 mL de agua destilada y se midió la absorbancia a 450 nm ( $OD_{450}$ ) en el espectrofotómetro (Figura 5).

### 7.3. Validación y precisión del método.

La validación y la precisión del método fueron realizadas evaluado los siguientes puntos:

a) La linealidad del sistema. Se realizaron curvas tipo de 0 a 2 g/L con una solución stock que contenía: n-butanol (10 g/L), acetona (4 g/L) y etanol (1 g/L), a 8, 9 y 10 minutos. Se graficó la concentración de butanol [mg/mL] contra la absorbancia ( $OD_{450}$ ) para obtener la ecuación lineal por medio del método de mínimos cuadrados usando Excel (Microsoft, USA).

b) El límite de detección (LOD). Es la cantidad del analito más pequeña que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, por encima del ruido en un proceso y dentro de un nivel de confianza establecido. Fue determinado a través de la siguiente ecuación:

$$LOD = \bar{x} + 3s,$$

donde:  $\bar{x}$  es igual al promedio de una solución que contiene 0% del analito (solución blanco) determinado bajo las condiciones del ensayo.

c) El límite de cuantificación (LOQ). Es la cantidad más pequeña que puede ser cuantificada en las muestras con una precisión y exactitud aceptables. Fue determinado a través de la siguiente ecuación:

$$LOQ = \bar{x} + 10s$$

donde:  $\bar{x}$  es igual al promedio de una solución que contiene 0% del analito (solución blanco) determinado bajo las condiciones del ensayo.

d) La repetitividad. Fue determinada por la cuantificación de alcoholes de dos soluciones de concentración conocida diez veces en el mismo día.

e) La reproducibilidad. Fue determinada por la cuantificación de alcoholes de dos soluciones de concentración conocida en diferentes días.

#### 7.4. Comparación del método. Fermentación ABE con *Clostridium acetobutylicum*

Hasta este punto, todos los ensayos fueron realizados empleando una matriz limpia. Para comprobar la efectividad del método simultáneo de separación de alcoholes, se aplicó en matriz sucia, es decir, se analizaron muestras provenientes de una fermentación ABE por *Clostridium acetobutylicum* 824 ATCC y se compararon los valores obtenidos de concentración de alcoholes por el método de burbujeo de aire con la técnica de microdifusión desarrollada por Noriega et al.

##### 7.4.1. Microorganismo y fermentación ABE.

La cepa silvestre de *Clostridium acetobutylicum* 824 ATCC fue obtenida de la Colección Nacional de Cultivos Microbianos del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV). Fue conservada en medio Gu modificado (GMM) removiendo la asparagina de su formulación (Gu et al., 2009). Este medio contiene por litro: 50 g de glucosa, 0.75 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.75 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.4 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.01 g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1 g NaCl, 5 g de extracto de levadura, 2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 0.01 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Se inoculó *C. acetobutylicum* en una botella de suero de 100 mL con 20 mL de medio GMM purgado con nitrógeno por 20 minutos e incubado a 37°C por 36 horas sin agitación. A dicha botella se le añadió 20% (v/v) de una solución de glicerol (80% v/v) y se dispensó 1 mL de la mezcla resultante en viales de 1.5 mL que fueron congelados inmediatamente con hielo seco a -70°C.

El vial con 1 mL de la cepa conservada de *C. acetobutylicum* se creció en 20 mL de GMM contenidos en una botella de suero de 100 mL. Igualmente fue purgado con nitrógeno 20 minutos e incubado a 37°C por 36 horas sin agitación antes de ser transferido al fermentador como inóculo. La fermentación ABE se realizó en lote en un biorreactor de 0.75 L con agitación magnética a 200 rpm. El volumen inicial fue de 0.4 L de medio GMM previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos. El nitrógeno fue empleado para purgar el oxígeno del medio de cultivo antes de la inoculación y durante los experimentos. El pH inicial fue de 6.5 y se controló con NaOH 2N para evitar que bajara de 4.5. La temperatura fue mantenida a 37°C todo el experimento. Se recolectaron muestras de 5 mL específicamente de la etapa

solvetogénica para medir densidad óptica (biomasa), concentración de azúcares reductores y producción de solventes. La densidad óptica fue medida a 600 nm ( $OD_{600nm}$ ) con la dilución apropiada usando un espectrofotómetro Jenway 7315. Las muestras de la fermentación fueron centrifugadas (Sorvall MC 12) a 12000 rpm, a 4°C, por 15 minutos para separar las células y emplear el sobrenadante libre de células para cuantificar azúcares reductores por la técnica descrita por Miller (Miller, 1959) y para la cuantificación de alcoholes por microdifusión y *gas stripping* (método propuesto).

#### 7.4.2. Comparación del método de burbujeo por aire o *gas stripping* con la técnica de microdifusión.

Los resultados del método propuesto fueron comparados con los obtenidos por microdifusión. Para el ensayo de microdifusión, se colocó 0.5 mL de una solución saturada de  $Na_2CO_3$  (30.7 g disueltos en 100 mL de agua destilada) en el compartimiento exterior de la cámara de Conway (7 x 1.5 cm). Por otro lado, se colocó 1 mL de  $K_2Cr_2O_7$  (0.145 g disueltos en 100 mL de  $H_2SO_4$  10N) en el compartimiento interior de la misma cámara (4.5 x 0.9 cm). Para cada ensayo, se introdujo una curva estándar. Para ésta última, se preparó una solución stock con 10 g/L de butanol, 4 g/L de acetona y 1 g/L de etanol para simular las muestras de la fermentación ABE en fase solvetogénica, Se realizaron diluciones de dicha solución stock añadiendo 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 mL de éste en matraces aforados de 10 mL y así obtener una curva con 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 g/L de butanol. De la curva estándar se añadió 0.1 mL en el compartimiento exterior, y para las muestras, únicamente 50  $\mu$ L. Después de homogenizar, se introdujo cuidadosamente el compartimiento interior con unas pinzas de forma concéntrica al compartimiento exterior. Se tapó la cámara de Conway con un tapón de goma y se incubaron todas las muestras junto con la curva estándar 90 minutos a 45°C. Al finalizar el ensayo, se destaparon todas las cámaras de Conway y se retiró el compartimiento interior, al cual se le añadió 1 mL de agua destilada. Después de homogenizar, se leyeron todas las muestras a 450 nm en el espectrofotómetro.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Adaptación del método para cuantificación de alcoholes por burbujeo de aire.

#### 8.1.1. Comparación de los sistemas de burbujeo.

Para descartar la existencia de una diferencia estadísticamente significativa de las concentraciones obtenidas con cada uno de los sistemas de burbujeo (A, B y C), éstos se analizaron entre sí. Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 3. Comparación de las cuantificaciones realizadas en cada uno de los sistemas de burbujeo.

Sistema de burbujeo	Diferencia con respecto a la media	Significancia ( $\alpha$ )*
A con B	-0.02	0.6704
A con C	0.05	0.2577
B con C	0.06	0.1405

\*Método de ANOVA;  $\alpha=0.05$ .

#### 8.1.2. Efecto del flujo de aire sobre la reducción de dicromato en el sistema de burbujeo.

La evaluación de la reducción del dicromato de potasio durante 10 minutos con un volumen de operación de 5 mL conteniendo 10 mg de n-butanol (equivalente a una concentración de 2 g/L, es decir, 1 mL de la solución stock de 10 g/L y 4 mL de agua destilada) se muestra a continuación. (Figura 6).

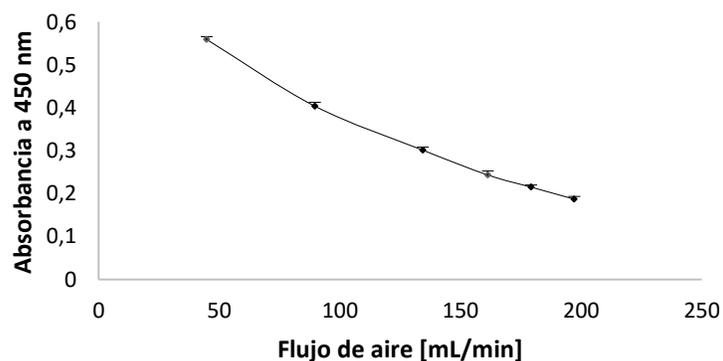


Figura 6. Evaluación de diferentes flujos de aire en cada sistema (A, B y C) diseñado para la cuantificación de alcoholes. La línea vertical sobre cada punto representa la desviación estándar entre los sistemas.

A partir de lo anterior, se decidió fijar el flujo de aire a 179.23 mL/min para los demás experimentos.

### 8.1.3. Efecto del tiempo de reacción sobre la reducción del dicromato en el sistema de burbujeo a diferentes cantidades de n-butanol.

En la Figura 7 se observa el resultado del ensayo de variación del tiempo de reacción y de la cantidad de n-butanol. Las cantidades que se probaron fueron: 10 mg (1 mL de solución stock más 4 mL de agua destilada), 30 mg (3 mL de solución stock más 2 mL de agua destilada) y 50 mg (5 mL de solución stock). Se puede ver que con 10 mg de n-butanol se obtiene la mejor linealidad respecto a las demás cantidades de n-butanol, pero es a partir de los 8 minutos en donde se aprecia que la reducción del dicromato de potasio es proporcional a la cantidad de alcoholes presentes.

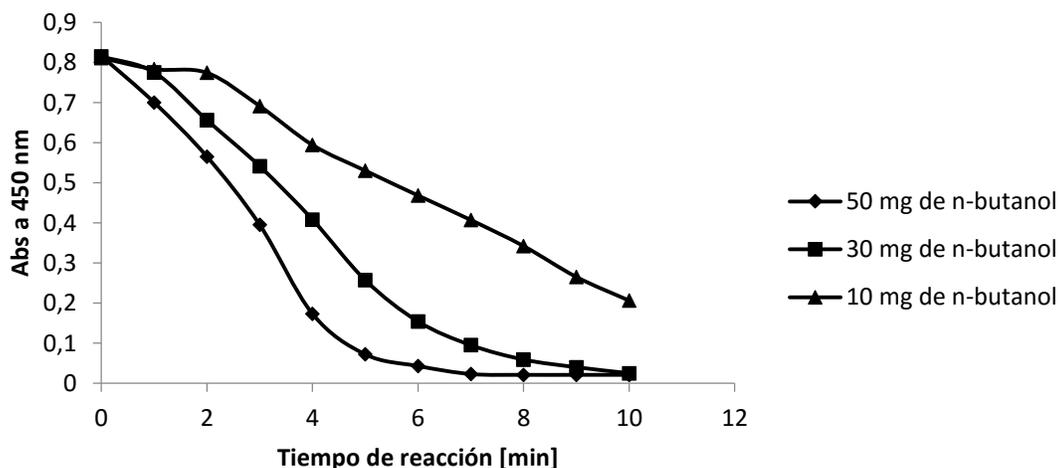


Figura 7. Efecto del tiempo de reacción a diferentes cantidades de n-butanol.

Al observar que con 10 mg de butanol se tenía la mejor linealidad con respecto al tiempo de reacción, se decidió optimizar el ensayo y por ello, en la Figura 8 se muestran los valores obtenidos desde 0 a 10 mg a 8, 9 y 10 minutos. La linealidad obtenida fue de 0.9952, 0.9827 y 0.9975, respectivamente. Con este experimento se decide fijar el tiempo de reacción a 10 minutos.

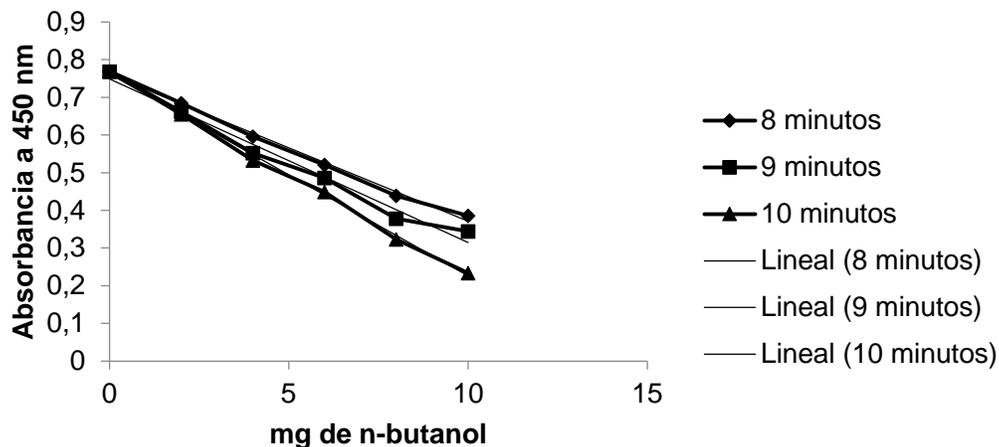


Figura 8. Efecto del tiempo a 8, 9 y 10 minutos sobre la reducción del dicromato de potasio de 0 a 10 mg de n-butanol.

## 8.2. Validación y precisión del método.

### 8.2.1. Evaluación de la linealidad del sistema.

Hasta este punto, todas las pruebas fueron realizadas con la solución stock 1 de n-butanol (10 g/L). Sin embargo, para poder cuantificar la cantidad de alcoholes presentes en las muestras de una fermentación ABE, se preparó una solución stock 2 con los componentes principales de la fase solvetogénica de *Clostridium acetobutylicum*. Dicha solución stock 2 contenía n-butanol (10 g/L), acetona (4 g/L) y etanol (1 g/L).

Habiéndose hallado que la mejor linealidad del sistema se obtenía de 0 a 10 mg de n-butanol con la solución stock 1 de n-butanol, se realizó nuevamente esta última curva tipo empleando la solución stock 2 con la mezcla de solventes que simuló la muestra de la fermentación. Las condiciones del ensayo fueron exactamente las mismas que fueron establecidas en la etapa 1. (Figura 9).

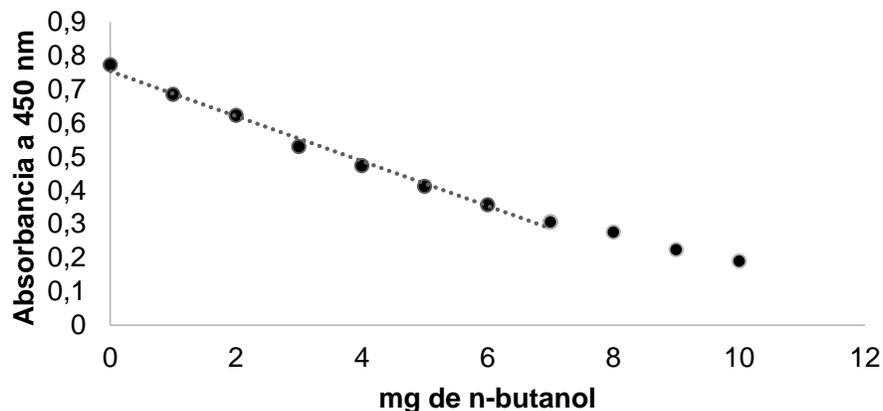


Figura 9. Linealidad de la reducción del dicromato de potasio con la solución stock 2.

La linealidad de la curva tipo empleando la solución stock 2, únicamente es lineal de 0 a 7 mg de n-butanol (es decir, de 0 a 109.636  $\mu$ moles de alcoholes totales) a los 10 minutos y con un volumen de operación de 5 mL. Esta última curva tipo se repitió con cada uno de los sistemas de burbujeo (A, B y C) (Figura 10). Los datos correspondientes a cada uno de los puntos, así como la desviación estándar y el coeficiente de variación entre los sistemas, se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4. Absorbancias obtenidas a 450 nm con cada uno de los sistemas de burbujeo (A, B y C) para la curva tipo con la solución stock 2.

Volumen de muestra [mL]	n-butanol [mg/mL]	Sistema			$\bar{x}$	s	% CV
		A	B	C			
0,7	1.4	0,376	0,379	0,373	0,376	0,003	0,798
0,6	1.2	0,435	0,437	0,427	0,432	0,005	1,225
0,5	1	0,505	0,503	0,501	0,502	0,002	0,398
0,4	0.8	0,571	0,574	0,587	0,581	0,009	1,465
0,3	0.6	0,635	0,638	0,640	0,639	0,003	0,394
0,2	0.4	0,713	0,718	0,718	0,718	0,003	0,402
0,1	0.2	0,791	0,777	0,783	0,780	0,007	0,900
0	0	0,868	0,873	0,874	0,872	0,003	0,369
Blanco de reactivo	-	0,878	0,879	0,878	0,878	0,001	0,066
Regresión lineal de las curvas tipo		0,998	0,9991	0,998	0,999	0,001	0,086

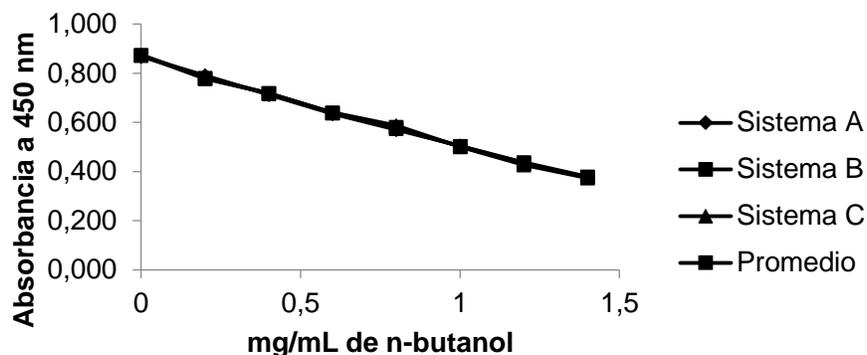


Figura 10. Curva tipo con solución stock 2 con cada uno de los sistemas de burbujeo (A, B y C).

### 8.2.2. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

Para calcular el límite de detección y el límite de cuantificación del método de burbujeo por aire, se calculó el promedio de las concentraciones que se obtienen en soluciones que carecen de alcoholes al emplear la curva tipo con la solución stock 2, y de esta forma, aplicar las ecuaciones correspondientes descritas en el apartado 7.3. Las mediciones se realizaron bajo las condiciones del resto de los ensayos.

Tabla 5. Obtención del límite de detección (LOD) y del límite de cuantificación (LOQ) del método de cuantificación de alcoholes por burbujeo de aire.

Repetición	Solución sin alcoholes	
	Absorbancia a 450 nm	Butanol [mg/mL] según curva tipo
1	0.538	0.014
2	0.548	0.000
3	0.538	0.014
4	0.545	0.000
5	0.540	0.006
6	0.547	0.000
7	0.540	0.006
8	0.547	0.000
9	0.545	0.000
10	0.540	0.006
Promedio ( $\bar{x}$ )	0.543	0.005
Desviación estándar (s)	0.004	0.006
	$LOD = \bar{x} + 3s$	0.021
	$LOD = \bar{x} + 10s$	0.061

### 8.2.3. Repetitividad de las mediciones.

Se realizó la cuantificación de alcoholes de dos soluciones de concentración conocida (aparte del punto 0, es decir, sin muestra y del blanco de reactivo). Dichas concentraciones fueron: a) 0.6 mg/mL de n-butanol, 0.24 mg/mL de acetona y 0.06 mg/mL de etanol (3 mg de n-butanol, 1.2 mg de acetona y 0.3 mg de etanol); y b) 1.2 mg/mL de n-butanol, 0.48 mg/mL de acetona y 0.12 mg/mL de etanol (6 mg de n-butanol, 2.4 mg de acetona y 0.6 mg de etanol).

En la siguiente tabla se muestran las concentraciones obtenidas en cada una de las repeticiones, así como la desviación estándar, el coeficiente de variación, el valor mínimo y el valor máximo.

*Tabla 6. Evaluación de la repetitividad de las mediciones para la cuantificación de alcoholes por el método de burbujeo de aire y reducción del dicromato de potasio.*

Repetición	Solución stock 2			
	0.6 [mg/mL]	0.06 [mg/mL]	1.2 [mg/mL]	0.12 [mg/mL]
	butanol	etanol	butanol	etanol
1	0.561	0.056	1.220	0.122
2	0.673	0.067	1.198	0.120
3	0.606	0.061	1.187	0.119
4	0.647	0.065	1.191	0.119
5	0.666	0.067	1.206	0.121
6	0.576	0.058	1.183	0.118
7	0.651	0.065	1.198	0.120
8	0.550	0.055	1.187	0.119
9	0.558	0.056	1.198	0.120
10	0.595	0.059	1.220	0.122
Promedio ( $\bar{x}$ )	0.608	0.061	1.199	0.120
Desviación estándar (s)	0.047	0.005	0.013	0.001
Coeficiente de variación (%)	7.779	7.779	1.104	1.104
Valor mínimo	0.550	0.055	1.183	0.118
Valor máximo	0.673	0.067	1.220	0.122

### 8.2.4. Reproducibilidad de las mediciones.

Para medir la reproducibilidad, se llevó a cabo la cuantificación de alcoholes de las mismas soluciones de concentración conocida empleadas en el apartado 8.5. El ensayo se efectuó con cada uno de los sistemas de burbujeo (A, B y C) en diferentes días (Tabla 7).

Tabla 7. Reproducibilidad de las cuantificaciones con el método de burbujeo.

Día	Solución stock 2			
	0.6 [mg/mL]	0.06 [mg/mL]	1.2 [mg/mL]	0.12 [mg/mL]
	butanol	etanol	butanol	etanol
1	0,603	0,060	1,199	0,120
2	0,569	0,057	1,188	0,119
3	0,646	0,065	1,173	0,117
4	0,628	0,063	1,209	0,121
Promedio ( $\bar{x}$ )	0,612	0,061	1,192	0,119
Desviación estándar (s)	0,033	0,003	0,015	0,002
Coefficiente de variación (%)	5,465	5,465	1,284	1,284

### 8.3. Fermentación ABE y cuantificación de alcoholes presentes en las muestras por burbujeo con aire y microdifusión.

Se tomaron muestras de la fermentación ABE por *Clostridium acetobutylicum* 824 ATCC a partir de la fase estacionaria, debido a que es el momento en el cual el incremento en la producción de n-butanol es significativo. La cantidad de alcoholes presentes en cada una de ellas fue cuantificada mediante la técnica de microdifusión y también con el método de burbujeo con aire. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 8. Cuantificación de alcoholes por microdifusión y por el método de burbujeo de aire.

Muestra	Promedio ( $\bar{x}$ ) [mg/mL]		Desviación estándar (s)		Coefficiente de variación (%)		Intervalo de confianza		Error de correlación (%)
	Microdifusión	Burbujeo de aire	Microdifusión	Burbujeo con aire	Microdifusión	Burbujeo con aire	Microdifusión	Burbujeo de aire	
1	7.552	7.660	0.250	0.250	3.313	3.265	[6.931,8.174]	[7.046,8.288]	17.490
2	9.733	9.657	0.182	0.186	1.873	1.922	[9.281,10.186]	[9.196,10.118]	17.000
3	11.5367	11.37	0.335	0.2787	2.904	2.451	[10.704,12.369]	[10.678,12.062]	23.070

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1. Adaptación del método para cuantificación de alcoholes por burbujeo de aire.

#### 9.1.1. Comparación de los sistemas de burbujeo.

Todas las cuantificaciones de alcoholes se llevaron a cabo en tres sistemas diferentes: A, B y C. El método de ANOVA fue usado para comparar la media de dichas cuantificaciones con cada uno de los sistemas y para buscar la diferencia estadística a un nivel de significancia del 5% ( $\alpha=0.05$ ). En la Tabla 3 se muestra la diferencia respecto a la media de las cuantificaciones, así como el valor de  $\alpha$  obtenido en cada uno de los casos. Para todos ellos,  $\alpha$  es superior a 0.05 permitiendo concluir que las diferencias en las cuantificaciones realizadas en cualquiera de los sistemas no son significativas y por consiguiente, se puede utilizar cualquiera de los tres sistemas en la cuantificación de alcoholes por el método de burbujeo de aire propuesto.

#### 9.1.2. Efecto del flujo de aire y del tiempo de reacción sobre la reducción del dicromato en el sistema de burbujeo.

Como parte de la adaptación del método, las cuantificaciones se comenzaron con la solución stock 1 para poder establecer las condiciones generales de operación del sistema. De esta manera se fijó un volumen de operación de 5 mL (32% del volumen del tubo de vidrio) y un flujo de aire a 179.23 mL/min (Ver Figura 5). Lo anterior se realizó con la finalidad de no trabajar en el nivel máximo posible ya que a partir de los 200 mL/min ocurre el arrastre del líquido por burbujas que rompen en el tapón de goma, provocando que el líquido pase a la solución de dicromato. Además de ello, se puede observar que es en este flujo donde la reducción del dicromato se vuelve lineal, y se asegura que el aire burbujeado contiene los alcoholes primarios para reducir el dicromato hasta un 73 %.

En ensayos realizados con dicromato de potasio para el método de microdifusión desarrollado por Noriega et al, se ha visto que mientras la reducción del dicromato sea menor al 64% (absorbancias superiores de 0.3 a 450 nm) la curva estándar sigue una tendencia lineal.

Con éste flujo de 179.23 mL/min se observó que con más de 10 mg de butanol contenidos en el ensayo la reducción del dicromato es más rápida y no muestra un comportamiento lineal (Figura 6) por lo que los siguientes experimentos se realizarán con cantidades

menores para determinar la reducción del dicromato de 64%. La primera opción fue reducir el tiempo de burbujeo a 9 y 8 min con diferentes cantidades de butanol sin embargo con los 10 minutos se obtiene un rango más amplio para la cuantificación de alcoholes por el método de burbujeo de aire en la curva tipo con un intervalo de 0 a 10 mg de n-butanol como extremos (0 a 2 mg/mL de n-butanol) (Ver Figura 7)

## 9.2. Validación y precisión del método.

### 9.2.1. Evaluación de la linealidad del sistema.

Una vez adaptado el método de cuantificación de alcoholes por burbujeo de aire, se realizó el cambio a la solución stock 2 para la cuantificación de alcoholes. Esta solución simula, en una matriz limpia, los componentes de las muestras en una fermentación ABE. Durante la fase solvetogénica de *Clostridium acetobutylicum*, los ácidos como el acetato y el butirato son reasimilados para la producción de acetona, butanol y etanol, componentes propios de la solución stock 2. Debido a que los alcoholes se oxidan a aldehídos con la presencia del dicromato de potasio en medio ácido, la acetona no formará parte de dicha reacción. Por consiguiente, la reducción del dicromato de potasio únicamente está asociada a la cuantificación de butanol y etanol. Dicha reducción es directamente proporcional a la cantidad de alcoholes presentes en la muestra o solución e inversamente proporcional a la absorbancia a 450 nm.

La linealidad de la curva tipo con la solución stock 2 se obtiene de 0 a 7 mg de n-butanol (de 0 a 1.4 mg/mL de n-butanol), con un coeficiente de correlación de 0.9916 y con una absorbancia a 450 nm superior a 0.3 con una reducción máxima del dicromato del 60% (Ver Figura 8). *Health Canada* (HC) en su manual de AMG (*Acceptable Methods Guidance*, por sus siglas en inglés) establece que el coeficiente de correlación para la determinación de ingredientes activos debe ser  $\geq 0.997$ , para impurezas 0.98 y para biológicos 0.95 (Health Protection Branch 1994), por lo que el coeficiente de correlación obtenido está dentro del criterio de aceptación. A cantidades mayores de alcohol, la velocidad de reacción disminuye. Una posible explicación sería que la concentración de dicromato disminuye y la velocidad de reacción depende también de la concentración del oxidante el cual debe permanecer en exceso.

### 9.2.2. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) fueron calculados para el sistema de burbujeo con aire. Los valores obtenidos fueron  $LOD=0.021$  mg/mL y  $LOQ=0.061$  mg/mL.

### 9.2.3. Repetitividad y reproducibilidad de las mediciones.

La precisión del método fue determinada a través de la repetitividad y reproducibilidad de las cuantificaciones de alcoholes.

Respecto a la repetitividad, se cuantificaron dos soluciones stock de 0.6 mg/mL y de 1.2 mg/mL de n-butanol diez veces el mismo día, obteniéndose un coeficiente de variación de 7.779 % y de 1.104 %, respectivamente (Tabla 6). El criterio de aceptación que establece *Health Canada* (HC) es de  $\pm 5\%$ , siendo la concentración de n-butanol de 1.2 mg/mL la única que puede considerarse aceptable.

A partir de estos resultados puede deducirse que cuando se tiene una concentración menor de alcoholes en la muestra, existe mayor error en la cuantificación. Por el contrario, tener una mayor concentración de alcoholes asegura una cuantificación confiable.

La reproducibilidad de las mediciones se llevó a cabo mediante la cuantificación de las mismas soluciones stock empleadas para repetitividad. Los coeficientes de variación obtenidos fueron de 5.465% para la solución stock de 0.6 mg/mL de n-butanol y de 1.284% para la solución stock de 1.2 mg/mL. El criterio de aceptación es de  $\pm 10\%$ , por lo que aunque ambos valores están dentro del mismo, se sigue observando que el error es inversamente proporcional a la concentración de alcoholes presentes en la muestra.

### 9.3. Comparación del método de burbujeo de aire con la técnica de microdifusión.

Para comparar las cuantificaciones realizadas con la técnica de microdifusión y el método de burbujeo de aire, el error de correlación fue obtenido para cada una de las muestras de la fermentación ABE. El 95% de intervalo de confianza fue calculado para cada muestra por ambos métodos. Dichos intervalos tienen un área denominada área de correlación, las cuales son graficadas. El área que no esté superpuesta es considerada el error de correlación entre ambos métodos (Ver Tabla 8). Todos estos análisis fueron realizados usando MATLAB (The MathWorks INC, 2016). En todas las muestras, el coeficiente de variación de las cuantificaciones está dentro del criterio de aceptación de  $< 5\%$ . Sin

embargo, no sucede de la misma manera para el error de correlación. Este último valor es elevado en todos los casos, pese a que las desviaciones estándar y los promedios en cada método son muy similares entre sí. Para medir estos parámetros, es importante contar con un número elevado de muestras a procesar, es decir, resulta necesario llevar a cabo más fermentaciones ABE para poder realizar mayores cuantificaciones de alcoholes, poder disminuir dicho valor y llegar a conclusiones más precisas.

Debido a que en las muestras de las fermentaciones ABE el butanol se encuentra en una mayor proporción que el etanol (aproximadamente de 10:1), a partir de los valores de las concentraciones obtenidas y del coeficiente de correlación entre los datos, se puede considerar que ambos métodos son semicuantitativos para la determinación de butanol. Pese a todo lo mencionado anteriormente, el método de burbujeo de aire además de ser económico y simple, permite obtener una cuantificación muy cercana a la obtenida por microdifusión en menor tiempo (10 minutos; sin necesidad de centrifugar la muestra). Esta última ventaja permite dar por terminada una fermentación ABE en cuanto se detecte que ya no hay incremento en la producción de butanol, es decir, se ahorra tiempo que sin duda alguna repercute en la productividad final de cada cultivo.

## 10. CONCLUSIONES

Con el método de separación de alcoholes por burbujeo de aire es posible cuantificar de forma económica, simple, semicuantitativa y rápida la cantidad de butanol presente en una fermentación ABE.

## 11. RECOMENDACIONES PARA TRABAJO FUTURO

El presente trabajo aún constituye la primera etapa del desarrollo del método de cuantificación de alcoholes. Para reforzarlo, se requiere realizar lo siguiente:

- 11.1. Evaluar el método de separación de alcoholes por burbujeo de aire en fermentaciones ABE realizadas bajo diferentes condiciones. Esto permitirá confirmar que puede aplicarse y que los resultados obtenidos representan una respuesta confiable para determinar la mejor condición de producción de alcoholes.
- 11.2. Evaluar este sistema de cuantificación en fermentaciones con bacterias o levaduras cuyo alcohol producido sea mayoritariamente etanol.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Alley, E. R. 2007. Water quality control handbook. New York, N.Y.: McGraw-Hill.
- Andersch W, Bahl H, Gottschalk G. 1983. Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 18:327-332.
- Barton W.E, Daugulis A.J., 1992. Evaluation of solvents for extractive butanol fermentation with *Clostridium acetobutylicum* and the use of poly(propylene glycol) 1200, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 632-639.
- Bowles LK, Ellefson WL. 1985. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* 50:1165-1170.
- Buday, Z., Linden, J.C., Karim, M.N., 1990. Improved acetone-butanol fermentation analysis using subambient HPLC column temperature 12 p.p. 24-27.
- Connors, K.A. 1981. Curso de análisis farmacéutico (ensayo del medicamento). Reverté: España. p.p. 614-615
- Clugston, M. & Flemming R. 2000. *Advanced Chemistry*. Oxford University Press: Malaysia. pp. 452-453.
- Doria, M. C. 2009. Experimentos de química en microescala para nivel medio superior. Universidad Iberoamericana: México. pp. 230-231.
- Dürre P, Kuhn A, Gottwald M, Gottschalk G. 1987. Enzymatic investigations on butanol dehydrogenase and butyraldehyde dehydrogenase in extracts of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 26:268-272.
- Dürre P. 2005. Sporulation I clostridia. In: Dürre P, editor. *Handbook on clostridia*. Boca Raton: CRC Press. pp. 659-699.
- Dürre P. 2007. Biobutanol: An attractive biofuel. *Biotechnol J* 2:1525-1534.
- Ehrlich, D., Pirchl, M., Humpel, C. 2012. Effects of long-term moderate ethanol and cholesterol on cognition, cholinergic neurons, inflammation, and vascular impairment in rats. *Neuroscience* 205, 154-166.

Ezeji T.C., Qureshi N., Blaschek H.P., 2003. Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping. *World Journal of Microb. & Bioech.* 19, 595-603.

Ezeji T.C., Qureshi N., Blaschek H.P., Karcher P.M., 2005. Improving performance of a gas stripping-based recovery system to remove butanol from *Clostridium beijerinckii* fermentation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 27, 207-214.

Fernandez, J. (1956). El método de microdifusión de Conway: su aplicación en el dosaje de amoníaco, urea y nitrógeno no proteico. *Anales de la Facultad de Medicina*, 39(4).

Forman, L. W., Thomas, B. D., & Jacobson, F. S. (1991). On-line monitoring and control of fermentation processes by flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 249(1), 101–111.

Fu, P. 2009. Genome-scale modeling of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and prediction of pathway insertion. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 473-483.

Girio, F., Marques, S., Pinto, F., Oliveira, C., Costa, P., Reis, A. & Moura, P. (2017). *Biorefineries in the World*. Springer International Publishing. pp. 227-281.

Groot W. J., Van der Lans R.G.J.M., Luyben K.C.A.M., 1989. Batch and continuous butanol fermentations with free cells: integration with product recovery by gas-stripping. *Applied Microb. & Biotech.* 32, 305-308.

Gu, Y., Hu, S., Chen, J., Shao, L., He, H., Yang, Y., Yang, S., Jiang, W. 2009. Ammonium acetate enhances solvent production by *Clostridium acetobutylicum* EA 2018 using cassava as a fermentation medium. Pp.1225-1232.

Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J. & Tripathy B. 2017. *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*. Springer: Singapore. 1-21 p.p.

Hartmanis MGN, Gatenbeck S. 1984. Intermediary metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: Levels of enzymes involved in the formation of acetate and butyrate. *Appl Microbiol Biotechnol* 47:1277-1283.

Health Protection Branch. (1994). *Drugs Directorate Guidelines: Acceptable Methods*. National Health and Welfare.

Jin, C., Yao, M., Liu, H., Lee, C.F., Ji, J., 2011. Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 15, 4080-4106.

Jones DT, Woods DR. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol Rev* 50:484-524.

Kim BH, Bellows P, Datta R, Zeikus JG. 1984. Control of carbon and electron flow in *C. acetobutylicum*: Utilization of carbon monoxide to inhibit hydrogen production and to enhance butanol yields. *Appl Environ Microbiol* 48:764-770.

Kirschner M. 2006. N-Butanol. *Chemical Market Reporter* January 30-February 5, ABI/INFORM Global, p.42.

Lee, S.Y., Park, J.H., Jang, S. H., Nielsen, L.K., Kim, J., Jung, K.S., 2008. Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnol.Bioeng.* 101,209-228.

Lin, X., Fan, J., Wen, Q., Li, R., Jin, X., Wu, J., Qian, W., Liu, D., Xie, J., Bai, J., Ying, H., 2014. Optimization and Validation of a GC-FID Method for the Determination of Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation Products. Pp. 264-270.

Maddox I.S., 1989. The Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation: Recent Progress in Technology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.* 7, 189-220.

Matsumura M., Kataoka H., Sueki M., Araki K., 1988. Energy saving effect of pervaporation using oleyl alcohol liquid membrane in butanol purification. *Bioprocess Engineering.* 2, 93-100.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.

Nielsen D.R., Prather K.J., 2009. In situ product recovery of n-butanol using polymeric resins. *Biotechnology and Bioengineering.* 102, 811-821.

Noriega, L., Estrada, J., Ortega, J., Ruiz, R., Cristiani, E., Montes, M. 2016. Alternative non-chromatographic method for alcohols determination in *Clostridium acetobutylicum* fermentations. *Journal of Microbiological Methods*, 126(1) 48-53

Paredes C, Alsaker KV, Papoutsakis ET. 2005. A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nat Rev* 3:969-978.

Qureshi N., Blaschek H.P., 1999. Butanol recovery from model solution/fermentation broth by pervaporation:evaluation of membrane performance. *Biomass and Bioenergy.* 17, 175-184.

Qureshi N., Blaschek H.P., 2001. Recovery of butanol from fermentation broth by gas stripping. *Renewable Energy*. 22, 557-564.

Qureshi N., Hughes S., Maddox I.S., Cotta M.A. 2005. Energy-efficient recovery of butanol from model solutions and fermentation broth by adsorption. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 27, 215-222.

Qureshi N., Maddox I.S. 1998. Reactor Design for the ABE fermentation using cells of *Clostridium acetobutylicum* immobilized by adsorption onto bonechar. *Bioprocess. Eng.* 3, 69-72.

Oudshoorn A., Van der Wielen L.A.M., Straathof A.J.J. 2009. Assessment of Options for Selective 1-Butanol Recovery from Aqueous Solution. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 7325-7336.

Serrano, M. & Vélez, E. 2011. Comparación de valores de alcohol etílico en muestras de sangre y humor vítreo en cadáveres de la morgue del hospital Vicente Corral Moscoso. Tesis de Licenciatura. Universidad de Cuenca: Ecuador.

Singh, P. Singh, A., 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog. Energy Combust. Sci.* 37, 52-68

Singh, R. (2017). *Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future*. Springer: Singapore. 293-314 p.p.

Staggs, K & Nielsen, D. 2015. Improving n-butanol production in batch and semi-continuous processes through integrated product recovery. *Process Biochemistry*. 50: 1487-1498.

Tsuey, L.S., Arif, A.B., Mohamad, R., Rahim, R.A., 2006. Improvements of GC and HPLC analyses in solvent (acetone-butanol-ethanol) fermentation by *Clostridium saccharobutylicum* using a mixture of starch and glycerol as carbon source. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 11, 293-298.

Vane L.M. 2008. Separation technologies for the recovery and dehydration of alcohols from fermentation broths. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*. 2, 553-588.

Woods DR. 1995. The genetic engineering of microbial solvent production. *Trends Biotechnol* 13:259-264.

Zverlov VV, Berezina O, Velikodvorskaya GA, Schwars WH. 2006. Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: Use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:587-597.