

# Validación de método analítico para la cuantificación de compuestos de fermentación por HPLC-RI-UV

Espinoza Tapia Julio César<sup>1</sup>, LeBorgne Sylvie<sup>1</sup>, Olivares Hernández Roberto<sup>1</sup>,  
Hernández Guerrero Maribel<sup>1</sup>, González Reyes Leonardo<sup>2</sup>, Vigueras Ramírez Juan Gabriel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa. Departamento de Procesos y Tecnología, Av. Vasco de Quiroga 4871, Cuajimalpa de Morelos, Ciudad de México, C.P. 05300. México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco. Departamento de Ciencias Básicas, Av. San Pablo No. 180, Azcapotzalco, Ciudad de México, C.P. 02200. México.

\* Autor para correspondencia: jvigueras@cua.uam.mx

## Recibido:

04/octubre/2020

## Aceptado:

11/diciembre/2020

## Palabras clave:

Validación,  
HPLC,  
fermentación

## Keywords:

Validation,  
HPLC,  
fermentation

## RESUMEN

La producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica sigue ganando importancia, además de su principal uso como bio-combustible, el etanol es considerado un importante químico de plataforma, debido a su alto volumen de producción esperado. Durante el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos se producen compuestos furfural, tales como el furfural y el hidroximetilfurfural (HMF), los cuales inhiben el proceso de fermentación, y he ahí la importancia de detectarlos y cuantificarlos. El presente trabajo se enfocó en establecer y validar un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para cuantificar glucosa, etanol, ácido fórmico y acético, así como HMF y furfural, en un solo análisis. Esto se logró en un sistema isocrático de HPLC con dos detectores, índice de refracción (RI) y ultravioleta (UV<sub>220</sub>) acoplados en serie. El método mostro ser preciso y lineal hasta los 10 mg/mL con  $R^2 \geq 0.98$  y límites de detección de partes por millón

## ABSTRACT

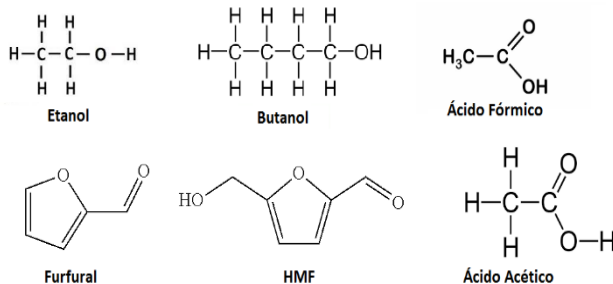
The production of bioethanol from lignocellulosic biomass continues to gain importance, in addition to its main use as a bio-fuel the ethanol is considered an important building block chemical, due to its high expected production volume. During pretreatment of lignocellulosic materials, furfural compounds are produced, such as furfural and hydroxymethylfurfural (HMF), which inhibit the fermentation process, hence the importance of detecting and quantifying them. The present study was focused on establishing and validating a high-performance liquid chromatography (HPLC) method to quantify glucose, ethanol, formic and acetic acid, as well as HMF and furfural, in a single analysis. This was achieved in an isocratic HPLC system with two detectors, refractive index (RI) and ultraviolet (UV<sub>220</sub>) coupled in series. The method proved to be accurate and linear up to 10 mg/mL with  $R^2 \geq 0.98$  and detection limits in the order of parts per million.

## Introducción

Hoy en día la utilización de biorrefinerías nos ha permitido aprovechar moléculas presentes en la biomasa lignocelulósica, para obtener biocombustibles y compuestos que pueden ser utilizados como materias primas para producir compuestos químicos de alto valor agregado (bloques base), que sean de utilidad para la obtención (de manera química o biológica) de otros compuestos orgánicos de alto valor comercial, como por ejemplo alcoholes, aldehídos, ácidos orgánicos, polioles, cetonas, aminoácidos, polímeros, entre otros (Werpy y Petersen, 2004; Fitz Patrick et al., 2010); y por ese motivo la producción de bioetanol obtenido a partir de biomasa lignocelulósica ha ganado gran importancia a nivel mundial. No obstante, aún es necesario atender algunas limitantes técnicas que permitan liberar los azúcares fermentables y otras moléculas de interés, utilizando procesos económicamente atractivos.

Los azúcares de cadena C5 y C6 son considerados como la principal materia prima de una biorrefinería, y son utilizados para producir biocombustibles a través de diversos procesos de fermentación alcohólica, que se llevan a cabo empleando levaduras; donde el producto final es etanol y en menor proporción butanol. Además de su principal uso como bio-combustible, el etanol obtenido de este tipo de procesos es considerado como un importante químico base o plataforma para la obtención de otros compuestos, esto derivado de su alto volumen de producción esperado. El etanol y butanol son precursores que pueden ser utilizados en la producción por deshidratación de sus correspondientes olefinas, y obtener etileno y butileno respectivamente (Isikgor y Becer, 2015). Durante el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos se producen compuestos tales como el hidroximetilfurfural (HMF) y furfural, los cuales no son deseables debido a que son inhibidores dentro del proceso de fermentación.

El etanol es un compuesto orgánico que tiene la fórmula química  $C_2H_5OH$ , que se obtiene mediante diversos procesos químicos, mientras que el bioetanol es una forma de etanol que se obtiene de un proceso biológico. El proceso de producción de etanol incluye tres etapas principales (fermentación, destilación y deshidratación) para el procesamiento de la caña azúcar, mientras tanto que en la producción de bioetanol requiere un tratamiento previo del material sustrato (principalmente materiales lignocelulósicos) con ácidos o enzimas seguidas de la fermentación; y por este motivo el bioetanol es considerado como una fuente energética renovable, mientras tanto el etanol no es considerado una fuente energética renovable.



**Figura 1.** Fórmula química de los principales compuestos generados en los procesos de tratamientos de materiales lignocelulósicos.

Hoy en día se requieren metodologías analíticas que sean aplicables a nivel industrial y que permitan cuantificar los productos de la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos, así como de los productos de fermentación. Por este motivo la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés, High-Performance Liquid Chromatography) es una técnica adecuada para este fin. Pero hay que tomar en cuenta que una limitante que presenta esta técnica (HPLC) es el detector con el que cuente el equipo, uno de los utilizados y encontrados es el detector de UV-Vis, pero para el análisis de los compuestos generados en un proceso de fermentación el detector de UV-Vis no ofrece resultados adecuados, esto debido a que las señales generadas se superponen y traslapan. Para el análisis de este tipo de procesos los detectores por índice de refracción (RI) ofrecen mejores resultados debido a que permiten una separación de las diversas señales generadas por los compuestos presentes.



**Figura 2.** Equipo HPLC Varian con detector de UV-Vis y detector IR.

Como se mencionó las técnicas cromatográficas nos permiten cuantificar dos o más componentes de una muestra, por lo cual son ampliamente utilizados en la

industria y centros de investigación, la medición obtenida debe ser confiable, por lo cual es necesario verificar su validez. El objetivo del presente trabajo fue establecer y validar un método cromatográfico que permita cuantificar azúcares, alcoholes, ácidos orgánicos e inhibidores de fermentación en un solo análisis.

## Metodología

La metodología empleada se basó en mayor parte en el reporte técnico NREL/TP-510-42623 reportado por Sluiter et al. (2006) con las modificaciones necesarias para separar azúcares, ácidos orgánicos, etanol y furfurales para realizar un solo análisis.

### Preparación de muestras

Se preparó una solución mezcla con el siguiente contenido (mg/mL): 25 glucosa, 20 etanol, 5 fórmico, 5 acético, 1 HMF, 1 furfural. A partir de la solución se prepararon diluciones 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 y 1:1000. Las muestras fueron preparadas centrifugadas a 10,000 rpm por 10 min y el sobrenadante fue filtrado con 0.22  $\mu\text{m}$ .



Figura 3. Preparación de las muestras y la solución muestra.

### Condiciones cromatográficas

El análisis cromatográfico se realizó en un sistema isocrático usando un HPLC (Varian ProStar 210, Palo Alto, CA, USA) equipado columna Aminex HPX-87-H (300 x 7.8 mm ID; Bio-Rad) y horno ajustado a 50 °C. La fase móvil fue  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.005M, pH 2.0 con flujo de 0.6 mL/min. El volumen de inyección fue 20  $\mu\text{L}$  de muestra y la detección se realizó por índice de refracción (RI) y ultravioleta a 220 nm (UV<sub>220</sub>).

### Adecuabilidad del sistema

Para verificar la adecuabilidad del sistema se inyectó por quintuplicado un estándar para análisis de ácidos orgánicos (Bio-Rad) conteniendo una mezcla de sales de oxalato, citrato, malato, succinato, formato y acetato.

### Análisis estadístico y parámetros de validación

Todos los análisis fueron realizados por quintuplicado y a partir de los resultados se determinó el promedio, desviación estándar y porcentaje de coeficiente de variación. Los parámetros determinados para la validación del método fueron: adecuabilidad, especificidad, linealidad, repetibilidad, reproducibilidad, límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) determinados como 3 y 10 veces respectivamente la señal del blanco. El criterio de aceptación fue establecido de acuerdo con la guía de validación de métodos analíticos (García et al., 2002).

Para verificar la estabilidad de las muestras y robustez del método, se realizaron análisis después de 36 h de almacenamiento a temperatura ambiente o refrigeración a 4°C tanto de las muestras como de la fase móvil, y se determinó el porcentaje de recobro de cada uno de los compuestos presentes en la mezcla.

### Resultados y discusión

#### Adecuabilidad del sistema cromatográfico

La adecuabilidad del sistema se verificó a través del análisis de un estándar de ácidos orgánicos, obteniendo para el acetato un número de platos teóricos de  $6219.7 \pm 0.2$ ; factor de colección de  $1.734 \pm 0.3$  y resolución de  $25.6 \pm 0.1$ , mostrando que el sistema cromatográfico es adecuado para llevar a cabo los análisis.

#### Cromatografía de compuestos de fermentación

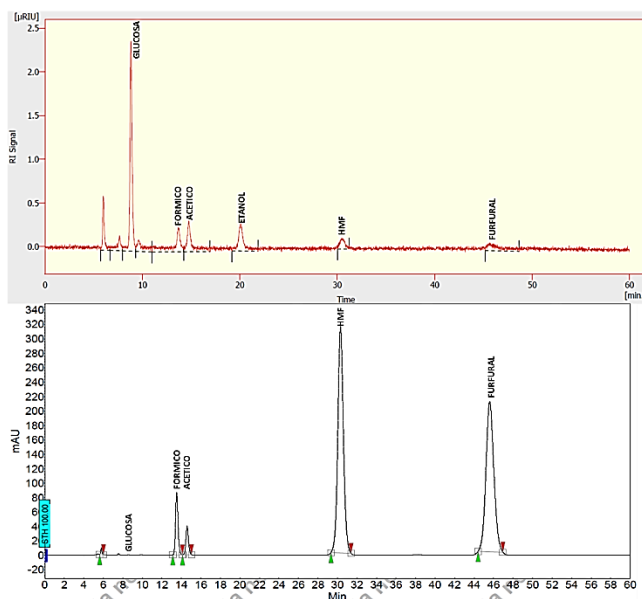
En la Figura 4 se muestran los cromatogramas de la mezcla de compuestos de fermentación, se puede observar que por índice de refracción pueden ser detectados todos los compuestos, sin embargo la señal del HMF y el furfural es débil y está muy cerca de la señal de la línea base, ambos con una concentración de 0.5 mg/mL, en contraste la respuesta obtenida en UV<sub>220</sub> es mayor para estos dos compuestos y el ácido fórmico, pero no así para la glucosa y el etanol los cuales no son detectados en UV<sub>220</sub> a una concentración de 5 y 4 (mg/mL) respectivamente.

El sistema de HPLC con detectores de RI y UV acoplados en serie, permite realizar en un solo análisis la separación y cuantificación de estos compuestos. Debido a sus características hidrofóbicas los furfurales presentan tiempos de retención mayores a los 30 minutos, lo cual hace que las corridas sean de alrededor de 50 minutos.

**Tabla 1.** Parámetros de validación de método analítico para la determinación de compuesto de fermentación por HPLC.

Compuesto	tr (min)	Linealidad $R^2 \geq 0.98$ (mg/mL)	LOD 3x señal blanco ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ 10x señal blanco ( $\mu\text{g/mL}$ )
Glucosa	8.7	0.2 - 20	50	200
Fórmico	13.5	0.2 - 20	30	100
Acético	14.6	0.2 - 20	50	200
Etanol	20.2	1 - 20	200	1000
HMF	31.7	0.01 - 10	6	10
Furfural	50.6	0.01 - 10	5	10

Tiempo de retención (tr). Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).



**Figura 4.** Cromatogramas de la mezcla (mg/mL) 5 Glucosa, 4 Etanol, 1 Fórmico, 1 Acético, 0.5 HMF, 0.5 Furfural, separados en columna Aminex HPX-87H detectados por índice de refracción (arriba) y por ultravioleta a 220 nm (abajo).

### Validación de método analítico

En la Tabla 1 se muestran los resultados del intervalo de linealidad así como el límite de detección y cuantificación para cada uno de los compuestos ensayados, es importante mencionar que la glucosa y etanol fueron determinados por RI mientras que los demás compuestos por UV.

La repetibilidad del método sometida a prueba por un solo analista bajo las mismas condiciones, así como la reproducibilidad llevada a cabo por dos análisis en dos

diferentes días tuvieron porcentajes de recobro del  $100.61\% \pm 0.2$  y  $99.87 \pm 0.68$  respectivamente con menor al 2.0%. La estabilidad de los compuestos se mantuvo por encima del 90% de recobro, después de 36 h de almacenamiento a temperatura ambiente o refrigeración a 4°C

### Conclusiones

Se logró establecer y validar una metodología para el análisis por HPLC con dos detectores acoplados RI y UV, que permite cuantificar los productos de la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos (glucosa, HMF y furfural), así como de los productos de fermentación (etanol, fórmico y acético) en un solo análisis, lo cual tiene potencial aplicación en los procesos de producción de bioetanol a partir de residuos. El método aún puede ser mejorado a fin de disminuir el tiempo de análisis.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a SEP-CONAYT CONACYT por el financiamiento otorgado al proyecto No. 287615

### Referencias

- García M.A., Soberón E., Cortés M., Rodríguez R., Herrera, J., Alcántara A., ... y Garzón, A. (2002). Guía de validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Biólogos México, AC México.
- Fitz Patrick M., Champagne P., Cunningham M.F., Whitney R.A. (2010). A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource technology*, 101(23), 8915-8922.
- Isikgor F.H., Becer C.R. (2015). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*, 6(25), 4497-4559.
- Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D. (2006). Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. Golden: National Renewable Energy Laboratory.
- Werpy T., Petersen G., Aden A., Bozell, J., Hollada J., White, J., ... y Jones, S. (2004). *Top value added chemicals from biomass*. Vol. 1-Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas (No. DOE/GO-102004-1992). Department of Energy Washington DC.